



Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée

Hicham Gouzi

► To cite this version:

Hicham Gouzi. Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066668>. <tel-01158909>

HAL Id: tel-01158909

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01158909>

Submitted on 2 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Chimie et Physique des Matériaux
(Ecole doctorale ED397)

Présentée par

Monsieur Hicham GOUZI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée

soutenue le 6 juin 2014

devant le jury composé de :

M. Mustapha Bourouina, Maître de Conférences, Université de Béjaia, Rapporteur

M. Pascal Griesmar, Professeur, Université de Cergy-Pontoise, Rapporteur

Mme Claude Jolival, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Examineur

M. Hamadi Lazouni, Maître de Conférences, Université de Tlemcen, Examineur

M. Thibaud Coradin, Directeur de Recherche au CNRS, Co-directeur de thèse

M. Abdelhafid Benmansour, Université de Tlemcen, Co-directeur de thèse

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1. Synthèse Bibliographique.....	4
1. La Polyphénol Oxydase.....	4
1.1 Introduction.....	4
1.2 Définition et réactivité des polyphenol oxydase.....	4
1.3 Caractéristiques structurales des PPOs.....	7
1.4 Source, localisation et rôle des PPOs.....	11
1.5 Extraction et purification de la PPO.....	12
1.6 Les mécanismes réactionnels de la PPO et leur étude.....	16
1.7 Les effecteurs de la PPO.....	20
2. Les biocapteurs à base de PPO.....	23
2.1 Introduction.....	23
2.2 Généralités sur les biocapteurs.....	23
2.3 Biocapteurs enzymatiques à base de PPO.....	29
2.4 Des biocapteurs aux bioréacteurs.....	36
Chapitre 2. Matériels et Méthodes.....	37
1. Matériels.....	37
1.1 Matériels biologiques.....	37
1.2 Produits chimiques.....	37
2. Méthodes biochimiques.....	37
2.1 Extraction et purification partielle de la PPO d' <i>Agaricus bisporus</i>	37
2.2 Extraction de la PPO de truffe de désert (<i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	38
2.3 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	39
2.4 Mesure de l'activité PPO.....	39
2.5 Etude de la stabilité de la PPO durant le stockage à -15°C.....	41
2.6 Détermination du pH optimal.....	41
2.7 Effet de la concentration de l'enzyme.....	41
2.8 Etude de la spécificité de substrat.....	42
2.9 Détermination des paramètres cinétiques.....	42
2.10 Stabilité thermique.....	42
2.11 Effet du sodium dodécyl sulfate.....	43
2.12 Effet des inhibiteurs.....	43
2.13 Etude de la stabilité thermique de la PPO.....	43
2.14 Etude cinétique et thermodynamique de l'inactivation thermique.....	44
2.15 Purification par la méthode partage en trois phases	46
3. Construction d'un biocapteur optique pour le dosage de la L-dopamine....	46
3.1 Procédé d'encapsulation.....	46
3.2 Détermination de l'activité de la PPO immobilisée.....	46
3.3 Relargage de la tyrosinase immobilisée.....	47
3.4 Effet du nombre de couches de silice-PPO.....	47
3.5 Effet du pH.....	47
3.6 Stabilité thermique.....	47
3.7 Détermination des paramètres cinétiques de la PPO immobilisée.....	47
3.8 Stabilité opérationnelle.....	48
4. Construction d'un bioréacteur à PPO pour la dégradation du phénol.....	48
4.1 Caractérisation de l'activité phénolase de la PPO soluble.....	48
4.2 Caractérisation de l'activité phénolase de la PPO immobilisée.....	49
5. Analyse des résultats expérimentaux.....	51

Chapitre 3. Extraction, Purification Partielle et Caractérisation de la PPO du Champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach).....	53
1. Extraction et purification partielle de la PPO du champignon de Paris.....	53
2. Caractérisation biochimique de la PPO du champignon de Paris.....	58
2.1 Effet du pH.....	58
2.2 Spécificité de substrat.....	60
2.3 Détermination des paramètres cinétiques.....	60
2.4 Effet de la concentration de l'enzyme.....	64
2.5 Stabilité thermique.....	65
3. Etude de l'inactivation thermique de l'activité catécholase.....	66
3.1. Etude cinétique.....	66
3.2. Analyse thermodynamique.....	71
4. Etude de l'inhibition de la PPO d'<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach...	73
4.1 Inhibition compétitive de l'activité triphénol oxydase par l'acide benzoïque et l'azide de sodium.....	76
4.2 Inhibition mixte-type I de l'activité triphénol oxydase par le fluorure de sodium.....	78
4.3 Inhibition mixte-type II de l'activité diphénol oxydase par le fluorure de sodium.....	79
4.4 Inhibition compétitive de l'activité diphénol oxydase par l'acide benzoïque.....	80
4.5 Inhibition mixte-type I de l'activité diphénol oxydase par l'azide de sodium.....	81
4.6 Bilan.....	82
Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (<i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	85
1. Extraction de la PPO de truffe de désert (<i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	85
2. Caractérisation de la PPO.....	85
2.1 Effet de pH.....	85
2.2 Stabilité thermique.....	87
2.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....	88
2.4 Effet de la concentration du substrat.....	89
2.4 Spécificité de substrat.....	92
2.5 Effet de la concentration de SDS.....	93
3. Etude de l'inactivation thermique de la PPO de truffe du désert	94
3.1. Etude cinétique	94
3.2. Analyse thermodynamique.....	100
4. Etude de l'inhibition de la PPO de truffe du désert	102
4.1 Inhibition non-compétitive par l'azide de sodium.....	102
4.2 Inhibition compétitive par l'acide benzoïque.....	104
4.3 Inhibition mixte-type I par le fluorure de sodium.....	105
4.4 Détermination des valeurs d'IC ₅₀	106
5. Purification par la méthode de partage en trois phases.....	110
6. Bilan.....	110
Chapitre 5. Immobilisation de PPO pour la mise au point de biocapteurs et bioréacteurs.....	111
1. Développement d'un biocapteur optique pour le dosage de la dopamine.....	111
1.1 Point de départ.....	111
1.2 Etudes préliminaires.....	112
1.3 Mise en place du procédé.....	114
1.4 Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique.....	115
1.5 Performances du biocapteur.....	117
1.6 Bilan.....	118
2. Développement d'un bioréacteur pour la dégradation du phénol.....	118
2.1 Détermination des paramètres cinétiques de la PPO libre et immobilisée.....	118

2.2 Effet de la concentration de l'enzyme.....	121
2.3 Effet de pH.....	122
2.4 Stabilité thermique.....	123
2.5 Etude de la stabilité opérationnelle.....	123
2.6 Bilan.....	125
Conclusions et perspectives.....	126
Références bibliographiques.....	128

Introduction générale

Introduction générale

Le champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) ainsi que les truffes constituent la majeure partie des champignons consommés dans le monde (Royse, 1996 ; Tsai et *al.*, 2007 ; Jeong et *al.*, 2010). Ces champignons sont une source alimentaire très appréciée pour leur propriétés médicinales et organoléptiques ainsi que pour leur richesse en protéines, en fibres, en lipides, en vitamines, en sels minéraux et en polyphénols (Braaksma et Schaap, 1996 ; Janakat et *al.*, 2004 ; Giannenas et *al.*, 2010 ; Jeong et *al.*, 2010).

Par rapport à la plupart des fruits et légumes, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (Varoquaux, 1978 ; Martinez et Whitaker, 1995). La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (Matheis, 1987). Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols -tyrosine, dopamine, γ -glutaminy-4-hydroxybenzène et γ -glutaminy-3,4-dihydroxybenzène- catalysée principalement par la polyphénol oxydase (polyphénol oxydase (PPO), monophénol, *o*-diphénol: oxygène oxydoréductase; EC 1. 14. 18. 1). La PPO est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979) et (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et *al.*, 2006). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme présente deux activités différentes. Elle est tout d'abord capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols, activité dite crésolase ou monophénolase. Ces *o*-diphénols, sont à leur tour oxydés pour donner des *o*-quinones, activité dite catécholase ou *o*-diphénolase. Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir regroupé sous le terme générique de mélanine (Varoquaux, 1978 ; Arslan et Doğan, 2005 ; Kolcuoğlu et *al.*, 2006).

La PPO a été isolée, purifiée et caractérisée à partir de différentes sources végétales, mais celle des champignons comestibles *Agaricus bisporus* et *Terfezia leonis* n'a pas reçu l'attention similaire. La première partie de notre étude sera donc consacrée à la recherche d'une meilleure compréhension des PPOs extraites à partir de ces deux champignons comestibles. Tout d'abord, on essayera d'étudier leurs propriétés biochimiques.

Outre son intérêt dans l'agro-alimentaire, la PPO, en tant que biocatalyseur, a de nombreuses autres applications possibles : l'élimination des phénols à partir des eaux usées (Sun et *al.*, 1992 ; Burton et *al.*, 1998 ; Bevilaqua et *al.*, 2002, Seetharam et Saville, 2003), la préparation de biocapteurs pour la détection de la concentration des phénols dans l'eau (Pena et *al.*, 2001; Topçu et *al.*, 2004 ; Marín-Zamora et *al.*, 2006), ou encore la production des *o*-diphénols comme la L-dopamine à partir de la L-tyrosine (Carvalho et *al.*, 2000 ; Marín-Zamora et *al.*, 2008).

Le phénol et ses dérivés sont des polluants toxiques présents dans les eaux usées qui proviennent de nombreuses industries, comprenant, la conversion du charbon, le raffinage du pétrole, la synthèse des résines, des plastiques, des colorants et du papier (Karam et Nicell, 1997 ; Seetharam et Saville, 2003). Vue son abondance et sa toxicité, l'élimination du phénol à partir des effluents aqueux industriels constitue un grand défi pour le contrôle de la pollution et la protection de l'environnement (Seetharam et Saville, 2003). Le phénol peut être éliminé par l'utilisation des microorganismes, du charbon actif ou par l'oxydation chimique. Ces méthodes présentent certains inconvénients, comme par exemple faible efficacité, coût élevée ou la libération des sous-produits qui sont plus toxiques (López-Molina et *al.*, 2003).

Le traitement enzymatique a été proposé par plusieurs chercheurs comme une alternative potentielle par rapport aux méthodes traditionnelles (Shao et *al.*, 2008 ; Karam et Nicell, 1997). La PPO présente l'avantage de catalyser la conversion des phénols en *o*-quinones, qui subissent une polymérisation non-enzymatique pour former un polymère insoluble qui peut être séparé à partir de la solution aqueuse par filtration (Shao et *al.*, 2008). L'utilisation de la PPO libre pour l'élimination du phénol présent dans les eaux usées industrielles est considérablement limitée par son coût élevé et son instabilité relative. En revanche, l'immobilisation de la PPO est préférable en raison de sa capacité à accroître la stabilité de l'enzyme et sa réutilisation en réduisant ainsi le coût. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à immobiliser la PPO du champignon *Agaricus bisporus* par encapsulation dans le gel d'alginate, l'une des matrices les plus couramment utilisées pour l'immobilisation des enzymes en raison de son faible coût, sa disponibilité et la simplicité de sa préparation (Khan et Husain, 2007), pour la dégradation du phénol et d'établir ensuite une comparaison entre sa cinétique homogène et hétérogène.

Nous nous sommes aussi intéressés à mettre au point un biocapteur à base de PPO pour la détection de la dopamine. La dopamine est l'un des neurotransmetteurs les plus importants, jouant un rôle significatif dans la fonction des systèmes nerveux central, rénale et

hormonale. Des taux inadéquats de dopamine peut provoquer plusieurs maladies et des troubles neurologiques comme les maladies de schizophrénie, de parkinson et d'Alzheimer. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détermination de la dopamine. La chromatographie liquide à haute performance, la spectrophotométrie à 230 nm, la fluorescence moléculaire, la chemiluminescence, la potentiométrie et l'ampérométrie sont les méthodes les plus utilisées. La plupart de ces méthodes sont compliquées, chères et qui nécessite beaucoup de temps (Sezginturk et al., 2010). Récemment les biocapteurs à PPO se sont avérés très utiles pour le dosage de la dopamine. L'immobilisation d'enzyme est l'une des étapes cruciales pour la conception et la fabrication de biocapteur, qui affecte directement la performance du biocapteur (Tan et al., 2011). Nous avons ici utilisé le procédé sol-gel déjà largement mis en jeu pour développer des biocapteur optiques (Jeronimo et al., 2007 ; Sassolas et al., 2012).

Ce manuscrit a été organisé en différents chapitres décrivant les étapes successives de cette recherche.

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur les polyphenol oxydase et leur application pour le développement de biocapteurs.

Dans un deuxième chapitre, nous décrivons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude

Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux obtenus de l'extraction, de la purification partielle et la caractérisation biochimique de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Nous présenterons les résultats expérimentaux de la caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) dans le quatrième chapitre.

Le cinquième chapitre est dédié au dosage de la dopamine par un biocapteur optique à PPO de truffe de désert immobilisée dans le gel de silice et à l'étude de la dégradation du phénol par la PPO de champignon de Paris immobilisée dans le gel d'alginate.

Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans le dernier chapitre.

Chapitre 1. Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Synthèse Bibliographique

1. La polyphénol oxydase

1.1 Introduction

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker, 1995 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981). La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la polyphénol oxydase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). La polyphénol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Robb, 1984 ; Escribano et *al.*, 1989). Ces recherches ont porté d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs (Bonner, 1956).

Les chercheurs se sont intéressés aux PPOs de diverses sources comme : les truffes (Miranda et *al.*, 1992 ; Miranda et *al.*, 1996 ; Perez-Gilabert et *al.*, 2001 ; Zarivi et *al.*, 2003), les champignons (Frieden et Ottesen, 1959 ; Smith et Krueger, 1962 ; Duckworth et Coleman, 1970 ; Papa et *al.*, 1994a,b ; Gouzi et Benmansour, 2007), la banane (Palmer, 1963 ; Ôba et *al.*, 1992 ; Sojo et *al.*, 1998 ; Thomas et Janave, 1986), les tubercules de pomme de terre (Patil et Zucker, 1965 ; Matheis, 1987a,b ; Pathak et Ghole, 1994 ; Cho et Ahn, 1999a,b ; Marri et *al.*, 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata, 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci, 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci, 2004), le coing (Yağar et Sağiroğlu, 2002), la pêche (Wong et *al.*, 1971), l'abricot (Chevalier et *al.*, 1999), les feuilles de tabac (Shi et *al.*, 200) et la cerise (Kumar et *al.*, 2008). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte et purifiée il y a bien longtemps (Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856), c'est beaucoup plus récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (Jolivet et *al.*, 1998).

1.2 Définition et réactivité des polyphenol oxydases

1.2.1 Définition et classification

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail (Dawson et Magee, 1955 ; Rescigno et *al.*, 2002).

Plusieurs noms ont été associés à la PPO dont la tyrosinase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est le nom « polyphénol oxydase » qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas. Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rivas et Whitaker, 1973).

L'enzyme PPO est une oxygénase oxydoréductase (Papa et *al.*, 1994). La classification et la spécificité de cette enzyme demeurent confuses et sont quelque peu ambiguës (Burton, 1994 ; Eicken et *al.*, 1999). La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC 1.10.3.2 *o*-diphénol : O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.2.2. Réactivité

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire :

- l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase). Les monophénoloxydases ou monooxygénases, catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est appelée tyrosinase car, la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase, en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et

initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux, 1978).

- l'oxydation des *o*-diphénols aux *o*-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase). L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Les *o*-quinones sont des composés fortement réactifs. Elles peuvent soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et *al.*, 2002 ; Cho et Ahn, 1999a ; Burton, 1994).

Les enzymes présentant une activité de type laccase (E.C. 1.10.3.2) sont parfois incluses dans la famille des PPOs. La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité *o*-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Reinhammar et Malmström, 1981). Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phytopathogènes et dans certaines plantes. On ne les trouve pas dans les fruits et légumes, à l'exception des pêches (Harel et *al.*, 1970) et les abricots (Dijkstra et Walker, 1991).

Nous pouvons distinguer les *o*- des *p*- diphénoloxydases en fonction de leur spécificité de substrat et/ou d'inhibiteur. Un degré d'oxydation différent pour le cuivre du site actif, ainsi que des différences dans les mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique, peuvent en partie expliquer les taux d'inhibition différents de ces deux enzymes pour le même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol (Keilin et Mann, 1940).

Un résumé de ces différentes activités PPO est présenté dans la Figure 1.

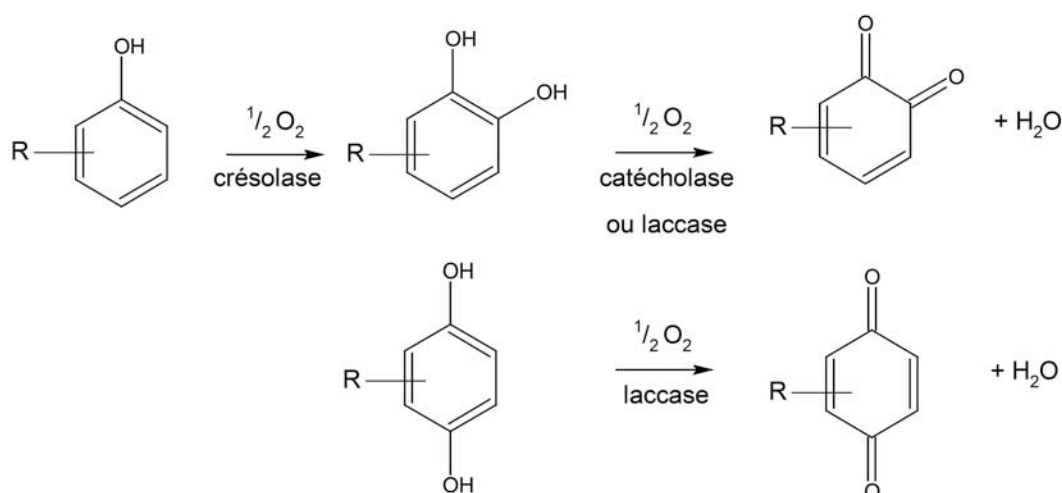


Figure 1 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.

1.3. Caractéristiques structurales des PPOs

1.3.1. Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2003). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et *al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et *al.*, 1997).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs est maintenue par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente cystéine-histidine est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (Klabunde et *al.*, 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer, 1987). Seule la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active a été résolue (Klabunde et *al.*, 1998).

La PPO native du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L demeure inconnue. Ces sous-unités pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H_2L_2 . Alors que la forme active de l'enzyme montrant l'activité crésolase et catécholase a la composition en sous-unités L_2H . Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Strothkamp et al., 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker, 1995 ; Solomon et al., 1996 ; Van Gelder et al., 1997 ; Jolivet et al., 1998 ; Fan et Flurkey, 2004).

Selon Wichers et al. (1996), les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique. Les PPOs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Robb, 1984 ; Jolivet et al., 1998).

Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (Mayer et Harel, 1979 ; Anosike et Ayaebene, 1982). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

1.3.2. Le site actif

La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (Mayer et Harel, 1991 ; Turner, 1974 ; Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin et al., 1992).

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghebeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts

disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice $\alpha 2$ (Figure 2). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 3). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice $\alpha 2$, tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice $\alpha 3$. Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$ (Klabunde et *al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 4) (Van Gelder et *al.*, 1997).

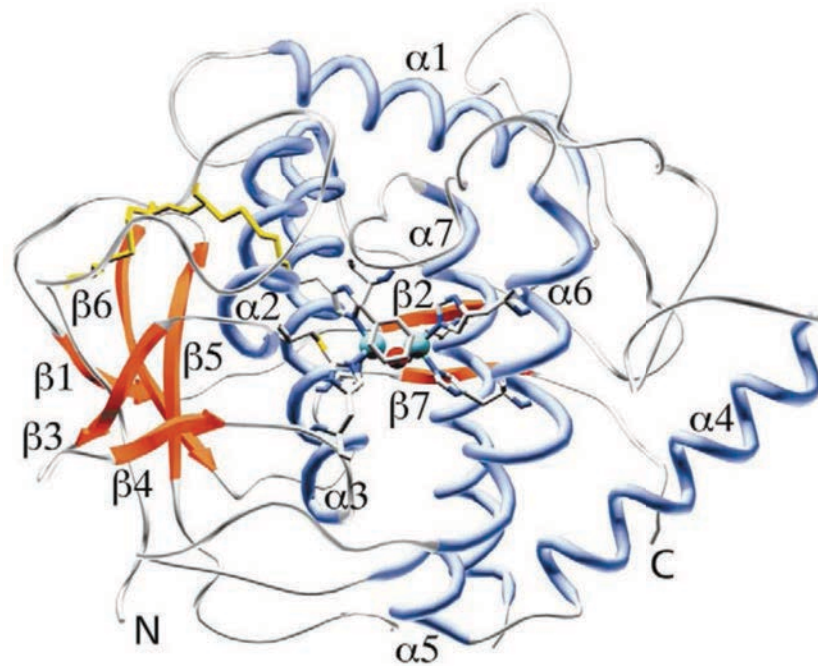


Figure 2: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).



Figure 3: L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

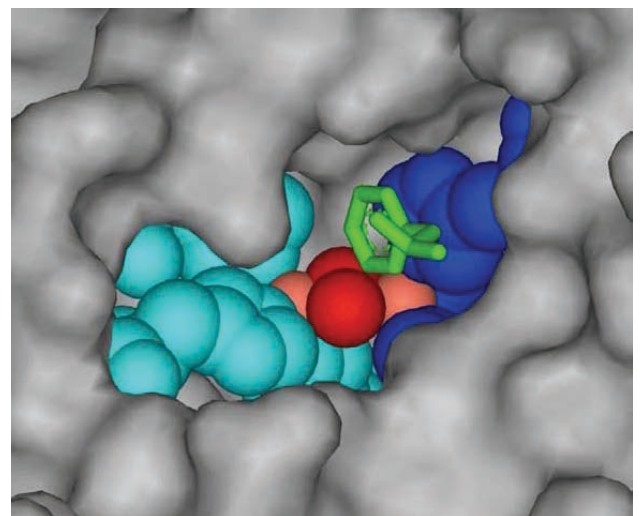


Figure 4: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).

1.4 Source, localisation et rôle des PPOs

1.4.1 Source et localisation

Les PPOs ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Anderson, 1968 ; Vaughn et Duke, 1984 ; Mayer et Harel, 1979 ; Zawistowski et *al.*, 1991. Whitaker et Lee, 1995). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

Les meilleures préparations des PPOs sont issues de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon et *al.*, 1996). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus*, est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la PPO (Chen et Flurkey, 2002 ; Burton, 1994). La PPO est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (Zhang et Flurkey, 1997). La localisation intracellulaire de la PPO d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet et *al.*, 1998). Bonner (1955) a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder et *al.* (1997) ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol. La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble dépend de l'espèce, de l'âge, et dans les fruits ou les légumes, de la maturité (Vámos-Vigyázó, 1981). Le niveau de l'activité de la PPO dans les plantes dépend de l'espèce, de la maturité, de l'âge et du stockage. Dans certains cas, cette activité peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables. Cette activité est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

1.4.2. Rôle

Depuis leur découverte en 1895, la PPO reste une énigme physiologique (Vaughn, et Duke, 1984). Plusieurs hypothèses sont proposées au sujet de sa fonction (Thygesen et *al.*, 1995 ; Steffens et *al.*, 1998). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique de ses formes

actives laisse supposer qu'elle intervient directement dans la photosynthèse, et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh, 1999). En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn (1991), ont montré que la PPO était structuralement associée au photosystème II dans la fève *Vicia faba*.

Dans les plantes, les PPOs jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPOs sont largement controversés (Vaughn *et al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Walker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises au sujet de leur action. L'une des certitudes est que les polyphénols ont des propriétés anti-fongiques (Friedman, 1997). La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel, 1986), et se polymérisent ensuite pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes (Zawistowski *et al.*, 1991). Selon Craft et Audia (1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

La PPO est impliquée dans divers processus tels que la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker, 1995 ; Fenoll *et al.*, 2004).

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Elle peut induire des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels, décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens *et al.*, 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vámos-Vigyázó, 1981; Vaughn et Duke, 1984 ; Zawistowski *et al.*, 1991).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee, 1995).

1.5 Extraction et purification de la PPO

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la PPO date d'il y a quelques décennies (Wichers *et al.*, 1995). Elle a été pour la première fois préparée presque simultanément par Kubowitz (1938) à partir de la pomme de terre, et par Keilin et Mann (1938) à partir du champignon de couche (*Agaricus bisporus*). Plusieurs méthodes

d'extraction et de purification de la PPO de champignon de couche ont été développées. Parmi les méthodes cités dans la littérature, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles : de Dawson et Magee (1955), de Frieden et Ottesen (1959), de Bouchilloux et *al.* (1963), de Nelson et Mason (1970), d'Atlow et *al.* (1984), de Papa et *al.* (1994), et de Fan et Flurkey (2004).

1.5.1 Extraction

Trois problèmes doivent être considérés avant d'extraire la PPO à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent la précipitation de la protéine enzymatique par les polymères (Vámos-Vigyázó, 1981). La latence est un problème mineur avec la PPO végétale, car dans la plupart des espèces l'enzyme est présente sous la forme active.

La PPO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la PPO, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004%. Ce qui suppose l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de PPO purifiée (Zawistowski et *al.*, 1991).

Les PPOs liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation d'agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen d'agents physiques comme les ultrasons (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Robb, 1984). L'extraction détersive des tissus augmente substantiellement le niveau de l'activité PPO (Whitaker, 1995). La solubilisation, est habituellement réalisée après préparation de poudre d'acétone ou extraction avec des détergents et autres agents. Il en résulte incontestablement une modification de la structure de l'enzyme et de ses propriétés (Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

Les plus grandes difficultés à surmonter lors de l'extraction de l'enzyme pour l'obtention d'une préparation soluble sont la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques endogènes et la formation des pigments pendant le broyage de la matière végétale. En effet, les pigments peuvent s'associer avec la protéine enzymatique et la rendre insoluble et inactive (Vámos-Vigyázó, 1981).

Pendant l'extraction de la PPO, des réactions de tannage peuvent avoir lieu, ce qui a pour conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991). Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la PPO doivent être effectuées aux très basses températures (-20°C voire -30°C). Dans tous les cas, des températures inférieures à 0°C sont conseillées (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou dans

l'azote exempt d'oxygène pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel sont recommandées comme premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes les plus souvent utilisées.

Parfois, l'extraction avec un tampon approprié précède l'étape de précipitation par l'acétone. La précipitation par l'acétone ne produit pas d'artefacts. Une grande variété de tampons est employée pour l'extraction, et les valeurs du pH, qui changent avec la source d'enzyme, sont en général, ajustées pour assurer un milieu légèrement alcalin. Le pH du tampon peut affecter la forme enzymatique obtenue. Afin de protéger le produit d'extraction contre l'oxydation enzymatique des polyphénols, des agents réducteurs ou des coupleurs de quinones, ainsi que des inhibiteurs réversibles d'enzymes, sont incorporés dans le milieu. L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, ou le saccharose, et parfois des mélanges de certains de ces composés, ont été employés (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de PPO. Elle peut être effectuée par addition dans l'extrait enzymatique d'adsorbants de composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). Nous avons constaté que ce procédé change, dans une certaine mesure, les caractéristiques cinétiques de la PPO de champignon dans le milieu organique, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques (Burton, 1994).

Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le plus souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions ; en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques. Elles sont également utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991; Ziyan et Pekyardimci, 2004). En même temps, le PVP est un inhibiteur partiellement compétitif de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, à cause peut-être de sa solubilité dans l'acétone, qui présente certains avantages pour l'obtention d'une préparation enzymatique brute. Malheureusement, le déplacement de ces phénols par des résines d'échange ionique ou d'autres composés se liant aux phénols (Bonner, 1955) peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes (Smith et Montgomery, 1985). Ainsi, le séchage par l'acétone, souvent appliqué comme première étape d'extraction d'enzymes,

est en même temps un moyen puissant d'élimination des phénols, particulièrement quand ils contiennent environ 20% d'eau. Le déplacement des substances pectiques des tissus de fruit peut être réalisé par précipitation par l'acétone ou l'acétate de calcium (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'extraction de la PPO peut être entravée par la présence d'enzymes protéolytiques endogènes, qui pourraient produire des formes multiples artéfactuelles et interconvertibles de l'enzyme. Cela a été mis en évidence lors de l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluoride, Trasylol, et phénylméthylsulfonyl), qui a conduit à la diminution du nombre de forme d'isoenzymes obtenues lors de la purification de la PPO de pêche et de datte (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.5.2 Purification

La purification d'une enzyme est indispensable pour connaître ses propriétés fonctionnelles et structurales (Pathak et Ghole, 1994). Cette tâche s'avère difficile à cause de la formation des *o*-benzoquinones qui se produisent pendant le broyage des tissus, qui réagissent rapidement en formant la mélanine, provoquant ainsi des modifications des protéines, dont la PPO (Whitaker et Lee, 1995). De plus, un autre inconvénient pour l'étude de la PPO est proportion relativement très faible (Kertesz et Zito, 1962 ; Robb, 1984).

Plusieurs méthodes de purification de la PPO ont été développées (Shi et *al.*, 2001 ; Burton, 1994). Elles diffèrent selon la source de l'enzyme et selon le degré de pureté atteint. Cependant, seuls quelques PPOs ont été purifiés jusqu'à un degré d'homogénéité suffisant pour être étudié convenablement (Zawistowski et *al.*, 1991).

Après l'extraction avec un tampon approprié, l'étape de purification de la PPO se fait par précipitation par le sulfate d'ammonium ou par des solvants organiques comme l'acétone ou l'éthanol. Le plus souvent, la précipitation par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation est suivie soit d'une chromatographie sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, soit d'une chromatographie d'échange ionique sur des échangeurs d'anions (DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex), ou enfin d'une combinaison de certaines de ces méthodes. Le DEAE-cellulose est un échangeur d'ion très utilisé pour la purification de certaines variétés de PPO. Entre chaque étape de purification, on utilise habituellement soit une dialyse, soit une ultracentrifugation, soit une chromatographie sur gel de Sephadex G-25 pour éliminer les impuretés de poids moléculaires faibles et aussi et surtout, les ions des différents tampons employés. Dans certains cas, une étape de purification est appliquée à plusieurs reprises. Par exemple, un procédé de purification de la PPO de champignon a été rapporté avec deux étapes de précipitations par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, précédée et/ou suivie d'une chromatographie sur DEAE-cellulose (Mayer et Harel, 1979, Zawistowski et *al.*, 1991 et Vámos-Vigyázó, 1981,

ont appliqué l'adsorption sur le gel de phosphate de calcium, suivie d'une chromatographie d'adsorption sur l'hydroxyapatite, pour la PPO de champignon. Lerman en 1953, pour la première fois a purifié la PPO à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité à base de cellulose sur laquelle des inhibiteurs phénoliques étaient greffés (acide benzoïque). Powell et *al.* (2007) ont purifié la PPO de champignon à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle des ions Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ou Zn^{2+} ont été fixés.

1.6 Les mécanismes réactionnels de la PPO et leur étude

1.6.1. Mécanismes réactionnels

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et *al.* (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* ($\text{CuII-O}_2\text{-CuII}$) et *met* (CuII-CuII). La forme *met*, est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 5). In vivo, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes et *al.* (2002).

Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par les PPOs, suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (Sanchez-Ferrer et *al.*, 1995). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (Espin et Wichers, 1999).

Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 5, cycle A) et crésolase (Figure 5, cycle B) est basé sur des informations liés à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre bi-nucléaire, ainsi que sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Siegbahn, 2003; Lerch, 1995). La forme *oxy* peut réagir avec les mono- et les diphénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols (Claus et Decker, 2006). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez et *al.*, 1992).

L'activité catécholase implique l'oxydation de deux *o*-diphénols en deux quinones, avec la réduction concomitante de $4e^-$ de l'oxygène moléculaire, qui produisent deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un *o*-diphénol de la forme *met* de l'enzyme,

suivie de la réduction du faisceau bicuivrique, menant à la formation du *deoxy*PPO et au dégagement d'o-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*PPO est

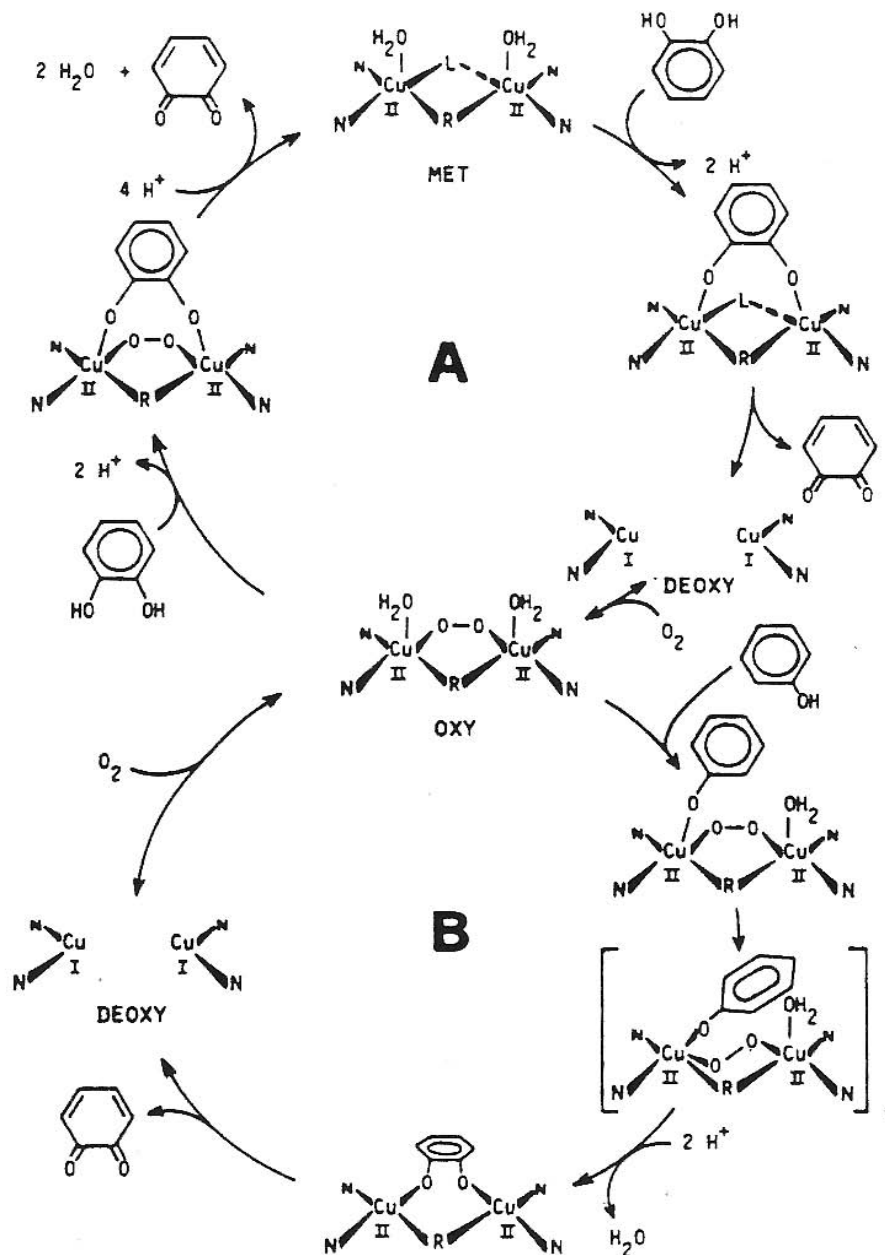


Figure 5: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la PPO (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).

formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre *o*-quinone.

Dans l'activité crésolase, l'O₂ est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxyPPO* pour donner l'*oxyPPO* dans laquelle l'O₂ a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxyPPO*, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de l'o-quinone (Solomon et *al.*, 1996 ; Solomon et *al.*, 2001 ; Fenoll et *al.*, 2004 ; Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1991 ; Siegbahn, 2004 ; Sánchez-Ferrer et *al.*, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998). Les étapes limitantes dans l'hydroxylation des monophénols pourraient être : (i) l'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la tyrosinase, (ii) l'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'*oxyPPO* sur le C-3 du substrat monophénolique, (iii) l'oxydation du o-diphénol formé à partir du monophénol (Fenoll et *al.*, 2000).

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme oxy semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (Eicken et *al.*, 1999). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp et *al.*, 1989)

1.6.2 Etude des activités PPO

L'activité de la PPO peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Il est nécessaire de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produits (Vámos-Vigyázó, 1981). Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent s'appliquer à une grande variété des substrats (Whitaker, 1995). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tel que l'espèce, le genre, le *cultivar*, ou également le tissu (Zawistowski et *al.*, 1991).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurée par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gauillard et *al.*, 1993 ; Naish-Byfield et Riley, 1992). La vitesse de formation du produit peut être déterminée par méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Espín et *al.*, 1995). La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine,

et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski et *al.*, 1991, Vámos-Vigyázó, 1981 ; Trebst et Depka, 1995).

Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, de grandes différences dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont constatées selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski et *al.*, 1991). A titre d'exemple, la substitution en position 3 du 3-méthyl catéchol cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la gêne stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4, comme dans le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique, augmente la réactivité du substrat, alors que celle d'un groupement attracteur d'électron, comme le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque, réduit la réactivité du substrat (Vámos-Vigyázó, 1981). Le catéchol est le substrat phénolique le plus simple de la PPO puisqu'il possède la structure de base des o-dihydroxyphénols. Ceci ne signifie pas qu'il s'agissait d'un meilleur substrat pour l'enzyme. La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase est la mesure de la production d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- 3H] monophénol tel que la [3.5- 3H] tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et *al.*, 1998). On peut également déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ($\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou le NADH à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mayer et *al.*, 1966 ; El-Bayoumi et Frieden, 1957 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.6.3 Effet du pH sur l'activité PPO

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (Kuby, 1991).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la PPO par : (1) l'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réaction catalytique, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H^+ ou les hydroxyles OH^- sont impliqués.

1.6.4 Effet de la température sur l'activité PPO

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement à l'effet du pH (Joslyn et Ponting, 1951; Vámos-Vigyázó, 1981). Amiot et *al.* (1997) ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements thermiques de courte durée en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

1.7 Les effecteurs de la PPO

1.7.1 Les activateurs

La PPO peut être activée par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), (Seo et *al.*, 2003 ; Pérez-Gilabert et *al.*, 2004 ; Gandía-Herrero et *al.*, 2005). Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Espín et Wichers, 1999).

Il a même été montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981; Fan et Flurkey, 2004; Van Leeuwen et Wichers, 1999).

1.7.2. Inhibition des PPOs

Le contrôle de l'activité de la PPO est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (Jolivet et *al.*, 1998; Qiu et *al.*, 2009). Les inhibiteurs de la PPO ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la PPO sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales (Mosher et Pathak, et Fitzpatrick, 1983) et cosmétiques (Maeda et Fukuda, 1991). Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la PPO peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. En outre, la PPO est l'une des plus importantes enzymes impliquée dans le processus muant d'insecte. La découverte des inhibiteurs de cette enzyme peut être ainsi importante pour le développement de nouvelles alternatives concernant le contrôle des insectes (Likhitwitayawuid, 2008).

L'inhibition de la PPO responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire. Dans l'industrie alimentaire, la toxicité relative au mode d'inhibition choisie, le coût de la méthode et/ou des composés chimiques, et l'acceptation de la méthode par le consommateur des composés chimiques et le produit final aident à la sélection de la méthode d'inhibition (Barthet, 1997). En théorie, le brunissement des fruits et des légumes par la PPO peut être empêché par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O_2 et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO ou qui empêchent la formation de la mélanine (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995).

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments, en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Les traitements thermiques de courte durée aux températures comprises entre 70- 90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses sources est inactivée thermiquement (Yemenicioğlu et *al.*, 1997 ; McCord et Kilara, 1983 ; Weemaes et *al.*, 1998a,b ; Soysal, 2008). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard. La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons peut induire une inactivation réversible ou irréversible de la PPO à des températures relativement basses (Terefe et *al.*, 2009 ; Weemaes et *al.*, 1998 ; Buckow et *al.*, 2009 ; Rapeanu et *al.*, 2005 ; Devece et *al.*, 1999). Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

Des centaines de composés ont été examinées comme des inhibiteurs du brunissement enzymatique (Whitaker et Lee, 1995). Ils ne doivent pas être toxiques, et ne doivent pas modifier le goût, la saveur ou la texture du produit (Vámos-Vigyázó, 1981). Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O_2 et substrat phénolique) et du pH et de la température (Zawistowski et *al.*, 1991).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la PPO en trois catégories :

1) Les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène,

- 2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique,
- 3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (Robb, 1984; Burton, 1994).

Puisque la PPO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et *al.*, 1998; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et *al.*, 2002 ; Mayer et Harel, 1979). Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels des PPOs de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs purement compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène (Rescigno et *al.*, 2002; Robb, 1984). L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2+} en Cu^+ (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991).

En outre, les composés qui ne ressemblent pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la PPO. Les analogues de substrat comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (Robb, 1984; Jolivet et *al.*, 1998; Gasowska et *al.*, 2002 ; Janovitz-Klapp et *al.*, 1990). L'inhibition de la PPO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites, SO_2 , l'acide ascorbique, l'acide érythorbique et les composés à fonction thiol (Kahn, 1985 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la PPO de plusieurs sources (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rescigno et *al.*, 2002). Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les α -quinones (McEvily et *al.*, 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif de la PPO (O'Sullivan, 1969).

Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP) agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la PPO, mais on sait pas s'ils agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (Jolivet et *al.*, 1998 ; Vámos-Vigyázó, 1981). Les cyclodextrines peuvent inhiber la PPO par fixation sur le substrat phénolique (Irwin et *al.*, 1994). L'acide

citrique inactive la PPO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et diminution du pH du milieu (MeEvely et *al.*, 1992). La grande majorité de ces inhibiteurs n'est pas spécifique des PPO (Mayer et Harel, 1991).

Les plantes sont considérées actuellement comme une source potentielle d'inhibiteurs de la PPO (Baurin et *al.*, 2002). Deux grands groupes ont été identifiés : les polyphénols et les aldéhydes et d'autres dérivés (Rescigno et *al.*, 2002 ; Chang, 2009). Parmi les composés isolés et considérés comme des inhibiteurs puissants de la PPO, nous pouvons citer le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercétine, la morine, la lutéoline, l'anisaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique (Parvez et *al.*, 2007).

2. Les biocapteurs à base de PPO

2.1. Introduction

La PPO est une enzyme ayant de multiples applications. Elle est utilisée dans la production des o-diphénols comme la L-dopamine et le catéchol (Min et *al.*, 2010 ; Seetharam et Saville, 2002 ; Marín-Zamora et *al.*, 2009 ; Tuncagil et *al.*, 2009).

La PPO sous forme soluble ou immobilisée est aussi largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivées au niveau des eaux usées (Yamada et *al.*, 2005 ; Seetharam et Saville, 2003 ; Ikehata et Nicell, 2000).

Enfin, seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase (Montealeali et *al.*, 2010 ; Kochana et *al.*, 2008), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Min et Yoo, 2009 ; Njagi et *al.*, 2010), le catéchol (Ameer et Adeloju, 2009 ; Tan et *al.*, 2010), le phénol et ses dérivés (Adamski et *al.*, 2010). Dans le domaine agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durán et Esposito, 2000), comme le cyanure (Shan et *al.*, 2004), l'acide benzoïque (Li et *al.*, 2010), l'azide de sodium (Cui et *al.*, 2006), et le fluorure de sodium (Asav et *al.*, 2009).

2.2. Généralités sur les biocapteurs

2.2.1 Biocapteurs enzymatiques

Les premiers biocapteurs, développés au début des années 1960, sont des électrodes enzymatiques permettant le dosage du glucose dans une solution biologique (Clark et Lyons, 1962 ; Updike et Hicks, 1967). Depuis, les biocapteurs ont connu un développement considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles, que ce soit dans les domaines médical, agro-alimentaire ou du contrôle de l'environnement. Dans ce dernier, les contraintes en termes de coût, de suivi en continu, de portabilité ... font des biocapteurs une

solution alternative, particulièrement intéressante, aux techniques traditionnelles (chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse ou chromatographie en phase liquide haute performance). Ils peuvent ainsi devenir des outils complémentaires et apporter des avantages, comme la mesure *in situ* et en continu, par rapport aux techniques classiques d'analyses disponibles en laboratoire.

Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé « biorécepteur » et un « transducteur » représentant le mode de détection (Tran-Minh, 1991). La Figure (6) présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans un milieu échantillon, toute l'information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour une utilisation ultérieure. On distingue deux types de biocapteurs (Comtat et Bergel, 1997):

- (1) « Les biocapteurs d'affinité » sont fondés sur de simples interactions entre les espèces chimiques en solution et le biorécepteur. La molécule à détecter n'est pas détruite.
- (2) « Les biocapteurs métaboliques » reposent sur une réaction spécifique entre l'espèce en solution et le biorécepteur. La molécule recherchée est alors dégradée. La diminution de la concentration d'un réactif ou la formation de produits est alors détectée.

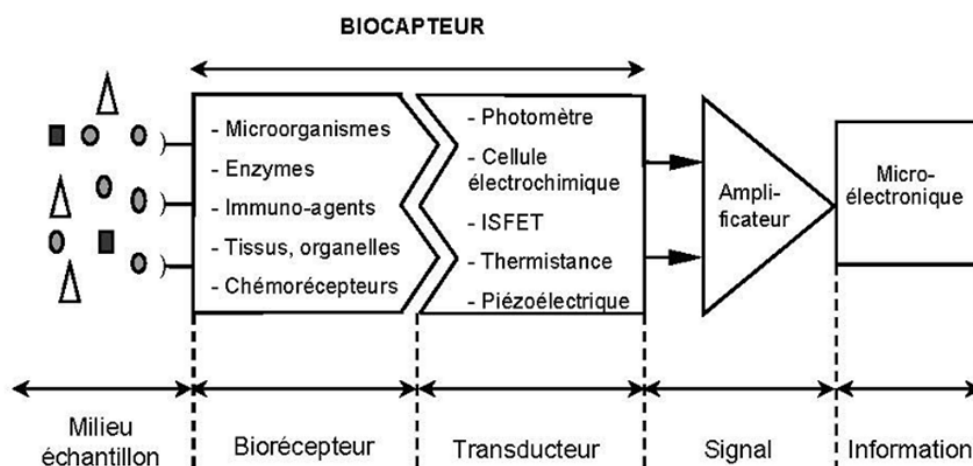


Figure 6: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur (Tran-Minh, 1991).

Le biorécepteur est le premier maillon du biocapteur. Il permet d'identifier l'espèce à détecter. En effet, l'élément biologique utilisé possède des sites particulièrement sélectifs. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire de l'espèce à mesurer. En présence du composé à doser, il doit fournir un effet physico-chimique détectable par le transducteur. L'activité du biorécepteur peut se traduire par des processus différents tels que la

biocatalyse, le couplage immunologique ou la chémoréception (Tran-Minh, 1991). Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une enzyme immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur : c'est le cas des capteurs enzymatiques.

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique du substrat par le biorécepteur pour la transformer en signal électrique. Le transducteur assure la conversion d'un type d'énergie en un autre. Le type de transducteur sera choisi en fonction des modifications biochimiques se produisant au niveau du biorécepteur. Cette adéquation entre le transducteur et l'élément biologique permettra d'obtenir un signal sensible, facilement exploitable et avec un minimum de bruit de fond (Tran-Minh, 1991 ; Comtat et Bergel, 1997). Le Tableau 1 regroupe les principaux types de transducteurs des biocapteurs.

Tableau 1: Les principaux types de transducteurs.

Type de transducteurs	Energie initiale	Energie finale
Electrode	Chimique	Electricité
Photodiode	Lumière	Electricité
Thermistor	Chaleur	Electricité
Cristal piézoélectrique	Masse	Electricité

De nombreux polluants sont connus pour leur action inhibitrice de certaines enzymes. Cette propriété a permis la mise au point de nombreux tests de détection. Parmi les inhibiteurs présents dans l'ensemble de l'environnement (eau, air, sol), les pesticides et les métaux lourds représentent un danger important pour la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes (Vidrine et *al.*, 2003). Des articles de synthèse font régulièrement le point et la promotion des biocapteurs. Les articles tels que ceux de Marty *et al.* (1995), Paddle (1996), Nistor et Emnéus (1999), Giardi *et al.* (2001), D'Souza (2001) montrent de nombreux exemples de biocapteurs et l'immense champ de recherches possibles.

2.2.2. Immobilisation des enzymes

L'immobilisation de l'enzyme au contact du transducteur ou placée dans une position optimale vis-à-vis du transducteur (par exemple au bout d'une fibre optique) doit être réalisée de sorte à ce que les critères suivants soient respectés pour le bon fonctionnement du biocapteur :

Stabilité : conservation de l'activité de l'enzyme pendant toute la durée des mesures,

Sélectivité : aptitude de l'enzyme à reconnaître un seul substrat défini,

Reproductibilité : aptitude de l'enzyme à retrouver son activité initiale après une mesure,

Sensibilité : capacité à détecter une concentration faible de substrat,

Accessibilité de l'espèce de reconnaissance : capacité du substrat de passer facilement à travers la couche sensible vers l'enzyme.

La capacité de la matrice à immobiliser l'enzyme, sa stabilité mécanique et chimique, son coût, la nature des liaisons mises en jeu, l'activation du support, sont également des paramètres à prendre en compte pour le développement d'un biocapteur enzymatique performant.

Depuis la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, beaucoup d'efforts ont été consacrés au développement des enzymes immobilisées, pour diverses applications. Cependant, quel que soit sa nature ou sa préparation, une enzyme immobilisée doit par définition effectuer deux fonctions essentielles : une fonction non-catalytique d'aide à la séparation, la récupération et la réutilisation de l'enzyme et la fonction catalytique de conversion des substrats dans un temps et un espace contrôlés. Une enzyme immobilisée peut être qualifiée de robuste lorsque les deux fonctions catalytiques et non-catalytiques remplissent les exigences d'une application bien spécifique. On distingue en général 4 méthodes d'immobilisation des enzymes destinées à la préparation de biocatalyseurs hétérogènes :

Adsorption physique

Cette technique considérée comme la plus ancienne méthode d'immobilisation, est basée sur l'adsorption physique d'une enzyme sur un support sans mettre enjeu des liaisons covalentes. L'accrochage se fait principalement par des attractions électrostatiques, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes ou interactions Van der Waals (Figure 7). Dans le cas où un support convenable est trouvé, cette méthode présente les avantages d'être simple et peu coûteuse puisqu' aucun réactif n'est mis enjeu pour la réaliser. Cette méthode n'exige qu'un minimum d'étapes d'activation avant utilisation et, elle offre la possibilité de régénérer le biocatalyseur par désorption et remplacement de l'enzyme. Cependant, en raison des faibles liaisons impliquées, l'enzyme peut être relarguée par suite d'un faible changement de température, de pH, de force ionique ou même par simple action du substrat.

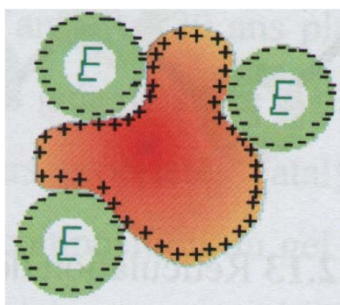


Figure 7: Adsorption physique par interaction électrostatique.

Liaisons covalentes

Cette méthode permet de greffer l'enzyme sur son support par une liaison chimique très stable (Figure 8). Mais la réaction de greffage doit se faire dans des conditions douces pour éviter de désactiver l'enzyme.

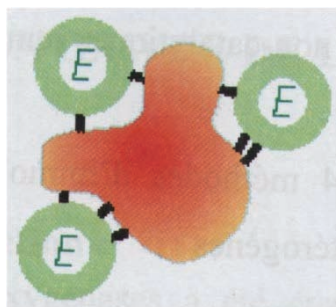


Figure 8: Immobilisation par liaison covalente.

De plus, cette méthode est beaucoup plus complexe à réaliser que celle d'adsorption physique. Par contre le risque de décrochage des enzymes au cours des réactions catalytiques est éliminé par le fait que les enzymes sont solidement fixées au support.

Réticulation

L'immobilisation des enzymes par cette méthode consiste à réaliser des liaisons intermoléculaires soit directement entre enzymes (Figure 9) soit par l'intermédiaire d'autres molécules présentant des groupements fonctionnels adéquats. Le réactif le plus fréquemment utilisé est le glutaraldéhyde.

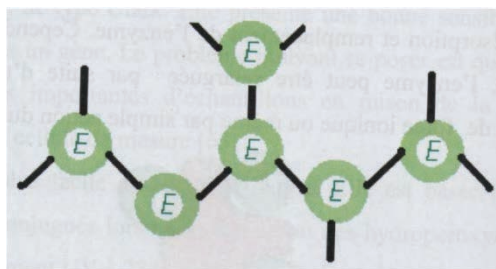


Figure 9: Réticulation des enzymes.

La réticulation des molécules d'enzyme entre elles est une méthode coûteuse. De plus, une partie des enzymes se comportent comme un support et la proximité spatiale des molécules d'enzyme entre elles limite la diffusion des substrats et produits, ce qui induit une baisse importante d'activité. Pour limiter ce dernier inconvénient, il est intéressant d'ajouter des molécules protéiques telles que l'albumine de sérum bovin (BSA) qui jouent le rôle d'espaceurs.

Encapsulation

La méthode d'immobilisation par encapsulation est basée sur la localisation d'une enzyme à l'intérieur d'une nano-capsule, dont la paroi peut être une membrane polymérique ou inorganique, poreuse (Figure 10). Cette paroi peut par exemple consister en un réseau sol-gel inorganique, tel que décrit dans la section suivante. L'objectif de la capsule est de maintenir l'enzyme « emprisonnée » tout en permettant la diffusion des substrats et produits. Cette méthode n'implique pas une liaison entre l'enzyme et la matrice ou la membrane. Un choix rigoureux de conditions d'immobilisation « douces » est également nécessaire pour éviter une perte importante de l'activité enzymatique.

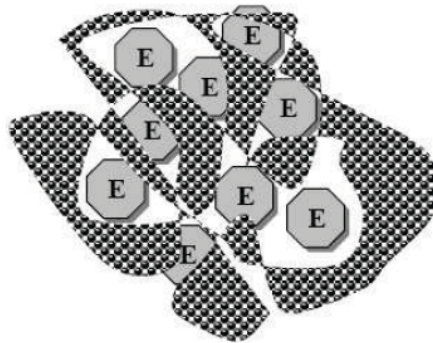


Figure 10 : Encapsulation des enzymes.

Avantages et Inconvénients des diverses techniques d'immobilisation

Les avantages potentiels associés à l'immobilisation des biocatalyseurs sont :

- 1- Une stabilité accrue vis-à-vis de la température et du pH.
- 2- Une meilleure résistance à la désactivation par les produits de la réaction.
- 3- Un développement aisé des procédés en continu.
- 4- Eventuellement, une activité accrue due à une meilleure dispersion de l'enzyme dans un solvant où elle ne serait pas soluble.
- 5- Une vitesse de transformation chimique accrue due à la possibilité d'utiliser une concentration élevée en catalyseur dans certains types de réacteur.

Cependant l'immobilisation présente aussi des inconvénients tels que :

- 1- La nécessité de développer un procédé d'immobilisation.
- 2- Un coût supplémentaire causé par les réactifs et le support.
- 3- Une limitation de la vitesse de transformation chimique due à la diffusion des substrats et produits.

Enfin, il est important d'insister sur le fait qu'il n'existe pas de méthode d'immobilisation universelle qui soit la meilleure pour toutes les enzymes ou pour toutes les applications d'une enzyme donnée.

2.3 Biocapteurs enzymatiques à base de PPO

2.3.1. Principes

Les biocapteurs enzymatiques ont été les premiers étudiés et restent très étudiés encore aujourd'hui. Un nombre important d'enzymes sont capables de convertir un composé (substrat) en consommant (par exemple de l'oxygène), ou en générant d'autres composés (par exemple du peroxyde d'hydrogène). En suivant la quantité de composés consommés ou produits, il est alors possible de doser le composé d'intérêt (substrat de l'enzyme). D'autres composés sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique. La mesure de la diminution de celle-ci permet alors de doser le composé inhibiteur.

Systèmes basés sur la conversion du substrat

De nombreux biocapteurs ont été développés pour la mesure de composés organiques (composés phénolique, anilines, amines aromatique). Parmi ceux-ci les biocapteurs fondés sur la PPO ont connu de nombreux développements. Les différents principes de fonctionnement de ce type de biocapteur vont être maintenant décrits. Ils illustrent des stratégies de développements transposables à d'autres enzymes.

La PPO catalyse la conversion de composés phénoliques en quinone via la réduction d'oxygène moléculaire en eau. La catéchol a été choisi comme substrat modèle. La réaction d'oxydation du catéchol en ortho-quinone est la suivante :



Les mesures de la quantité d'oxygène consommée (co-substrat) ou de l'ortho-quinone formée (produit formé) lors de cette réaction permettent le dosage de catéchol présent dans la solution échantillon.

Mesure de la consommation d'oxygène

Ce premier type de biocapteur à PPO consiste à mesurer l'évolution de la concentration d'oxygène au cours de la réaction enzymatique (Figure 11). La mesure de la concentration en oxygène peut être effectuée avec une électrode de Clark (Campanella et *al*, 1992 ; Campanella et *al* ., 1999). Il est également possible de mesurer la consommation en oxygène avec un capteur optique. Cette stratégie a été utilisée par Papkovsky et *al*. (1993).

Cette méthode de détection nécessite un contrôle de la concentration en oxygène des tampons et des solutions échantillons. Afin de contourner ce problème, des capteurs ont été développés pour détecter directement le produit de la réaction (l'ortho-quinone dans le cas de biocapteurs à PPO). Simkus et *al*. (1996) utilisent les propriétés optiques des produits formés pour les détecter. Une détection électrochimique est également possible.

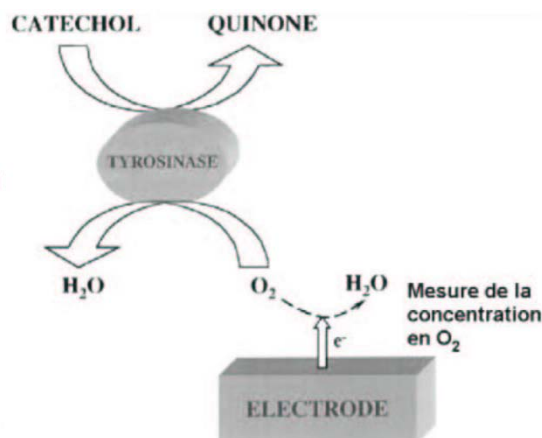


Figure 11: L'oxydation du catéchol en ortho-quinone consomme de l'oxygène. Cette variation de concentration en oxygène est mesurée par une électrode de Clark (Nistor et Emnéus, 1999).

Détection de la quinone formée (par une méthode électrochimique)

L'ortho-quinone est un composé électroactif qui peut être réduit en catéchol à un potentiel de -0,2 V/ECS (Figure 12). La mesure du courant de réduction permet de doser la quantité d'ortho-quinone produite par la réaction enzymatique et donc de doser le catéchol présent dans l'échantillon. Cette méthode comporte plusieurs avantages. En effet, la détection électrochimique de l'ortho-quinone permet son recyclage en catéchol, ce qui conduit à une amplification du signal. Les réactions de polymérisation par accumulation de l'ortho-quinone au niveau de l'électrode sont limitées par recyclage. A la différence de l'oxygène (-0,6 V/ECS), le potentiel de mesure de l'ortho-quinone (-0,2 V/ECS) permet de réduire le risque d'interférences électrochimiques provenant d'autres composés (Marko-Varga et *al.*, 1995).

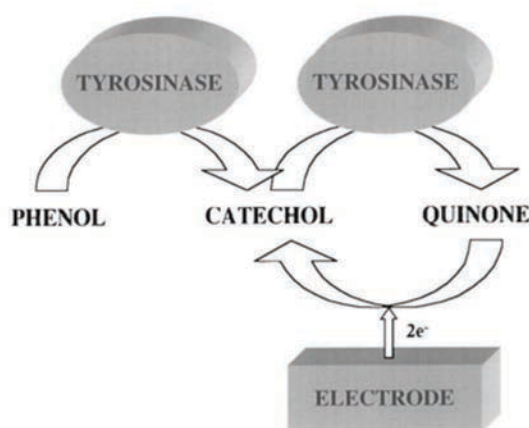


Figure 12: L'ortho-quinone (formée par l'oxydation enzymatique du catéchol) est réduite électrochimiquement en catéchol. Ce courant de réduction est mesuré et permet de doser la quantité d'ortho-quinone enzymatiquement formée.

Une variante de ce type d'électrode consiste à introduire un médiateur redox (symbolisé RH_2) afin d'augmenter le taux de transfert des électrons entre la quinone formée et l'électrode (Figure 13). La quinone est réduite en catéchol en réagissant avec le médiateur qui passe d'un état réduit (RH_2) à un état oxydé (R). Les médiateurs utilisés sont le ferricyanure, le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) et le méthylphénazonium (Hedenmo et *al.*, 1997).

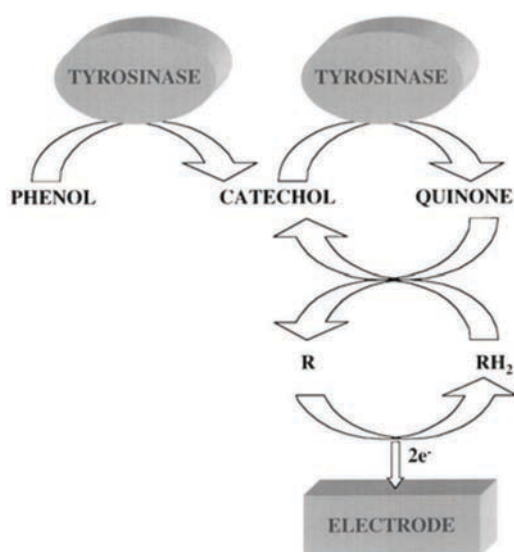


Figure 13 : L'ortho-quinone (formée par l'oxydation enzymatique du catéchol) est réduite en catéchol via l'oxydation du médiateur réduit (RH_2) en médiateur oxydé (R). La forme R du médiateur est alors réduite sur l'électrode. Ce courant de réduction est mesuré et permet de doser la quantité d'ortho-quinone enzymatiquement formée.

2.3.2. Les biocapteurs à PPO pour la surveillance de l'environnement

Les différentes méthodologies utilisées pour le développement de capteurs à PPO toujours plus performants sont généralisables à de nombreux biocapteurs enzymatiques environnementaux. Il est possible de classer les biocapteurs selon trois principaux groupes (Wollember et *al.*, 1994) :

- Les systèmes très spécifiques d'un composé à détecter et à doser
- Les systèmes permettant de doser et de détecter un groupe de molécules (par exemple une famille chimique).
- Les systèmes permettant de suivre une toxicité globale car, dans ce cas, le biorécepteur joue le rôle d'un bio-indicateur de toxicité (par exemple les électrodes à cholinestérase).

Chapitre 1. Synthèse Bibliographique

Tableau 2: Exemple de biocapteurs à PPO pour la détection des polluants dans l'eau.

Polluant	Support d'immobilisation	Détection	Limite de détection	Domaine de linéarité	Références
Cyanure	Argile anionique/Electrode de carbone vitreux	Ampérométrie	100 ppb	100-1000 ppb	Shan et <i>al.</i> (2004)
Atrazine	Poly 3,4-ethylene dioxythiophene	Ampérométrie	1 nM	5–500 nM	Védrine et <i>al.</i> (2003)
Diuron	Poly 3,4-éthylène dioxythiophene	Ampérométrie	0.5 nM	5–500 nM	Védrine et <i>al.</i> (2003)
Atrazine	Polypyrrole	Ampérométrie	0.1 ppm	0.05–0.5 ppm	El Kaoutit et <i>al.</i> (2004)
p-Chlorophénol	Polyacrylamide	Ampérométrie	0.03 µM	2.0–24.0 µM	Hervás Pérez et <i>al.</i> (2006)
Phénol	Chitosane	Optique	1.0 µM	2.5–70.0 µM	Abdullah et <i>al.</i> (2006)
p-Cresol	Chitosane	Optique	1.0 µM	2.5–100.0 µM	Abdullah et <i>al.</i> (2006)
Catéchol	Polyaniline	Ampérométrie	0.05 µM	2.5–140 µM	Tan et <i>al.</i> (2011)
Catéchol	Polypyrrole	Potentiometrie	1.0 µM	1–50 µM	Ameer et Adeloju (2009)
Cyanure	Polyamide	Ampérométrie	$2 \cdot 10^{-7}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ - $4 \cdot 10^{-5}$ M	Hu et Leng (1995)
Bisphenol A	Nanotube de carbone-phthlocyanine de cobalt-fibroïne	Ampérométrie	$3 \cdot 10^{-8}$ M	$5 \cdot 10^{-8}$ - $3 \cdot 10^{-6}$ M	Yin et <i>al.</i> (2010)
Atrazine	Réticulation avec SAB-Glutaraldehyde	Conductimétrie	1 ppb	2.15–2150 ppb	Mai Anh et <i>al.</i> (2004)
Diuron	Réticulation avec SAB-Glutaraldehyde	Conductimétrie	1 ppb	2.3–2330 ppb	Mai Anh et <i>al.</i> (2004)

De nombreux polluants sont connus pour leur action inhibitrice de certaines enzymes. Cette propriété a permis la mise au point de nombreux tests de détection. Parmi les inhibiteurs présents dans l'ensemble de l'environnement (eau, air, sol), les pesticides et les métaux lourds représentent un danger important pour la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes. Les caractéristiques analytiques de certains biocapteurs à tyrosinase développés pour la détection de polluants dans l'environnement sont indiquées dans le Tableau 2. Comme on peut le constater, une grande majorité de ces capteurs utilisent une détection électrochimique.

2.3.3. Immobilisation de PPOs en matrice sol-gel

Rappels sur la bioencapsulation par voie sol-gel

Actuellement, la chimie sol gel offre des possibilités nouvelles et intéressantes pour une immobilisation des biomolécules fragiles et sensibles aux conditions du milieu réactionnel (enzymes, protéines, anticorps, cellules complètes).

Le gel de silice est le plus utilisé dans ce domaine du fait de la faculté d'ajustement de ces gels à une large gamme de textures poreuses, structures de réseau, fonctionnalités de surface et conditions de synthèse. Par exemple, le pH, le temps de gélification ou l'hydrophobicité peuvent être modifiés suivant le type d'enzyme ou l'application. Bien entendu, un gel pré synthétisé peut immobiliser l'enzyme par adsorption ou par greffage covalente sur sa surface accessible, mais la technique d'encapsulation par laquelle l'enzyme est immobilisé en construisant le réseau poreux du gel autour de chaque macromolécule, semble très intéressante. L'encapsulation dans d'autres oxydes tels que TiO_2 (Chen et *al.*), ZrO_2 synthétisé à partir du sel inorganique $\text{Zr}(\text{NO}_3)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lieu et *al.*, 1999), l'alumine (Chen et *al.*) ou des phyllosilicates réticulés avec un gel de silice (Shen et *al.*, 2001) a aussi été étudiée mais moins extensivement que SiO_2 .

Deux principales voies sont connues pour réaliser un oxyde par méthode sol-gel :

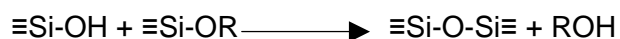
- 1- La voie des solutions aqueuses contenant le cation de l'élément dont on veut réaliser un oxyde. Ex : un sel de cet élément.
- 2- La voie des alkoxydes, lesquels constituent une classe particulière de composés métal-organiques étudiés avec un grand intérêt depuis environ 25 ans. L'oxygène de ces composés est directement lié à un métal par une liaison à caractère nettement covalent polaire (Pierre et *al.*, 2004).

Les gels de silice sont le plus souvent synthétisés selon la deuxième voie qui consiste à transformer chimiquement des précurseurs d'alkoxydes tétrafonctionnels avec l'aide d'un catalyseur acide et/ou basique. Au niveau du groupe fonctionnel alkoxy OR, trois types de réactions sont généralement utilisées pour décrire le procédé sol gel (Liu et *al.*, 1999).

Les réactions d'hydrolyse qui engendrent des fonctions « silanol » Si-OH en remplaçant les groupes alkoxy (OR) par un groupe hydroxyle (OH).



Les fonctions silanol permettent l'initiation des réactions de condensation, qui forment des ponts siloxane (Si-O-Si) par condensation de deux groupements silanol, libérant une molécule d'eau. La condensation peut aussi se produire entre un groupement alkoxy et un autre silanol, en libérant une molécule d'alcool.



Un sol peut être défini comme étant une dispersion stable de particules colloïdales au sein d'un liquide, avec des dimensions qui doivent être comprises entre 2 et 200nm (Pierre et *al.*, 2004). Dans le cas de la silice, les particules ayant la taille adéquate pour réaliser des sols comprennent des particules qui sont à la frontière entre les macromolécules et les nanoparticules de matière solide. Le liquide dans lequel ces particules colloïdales sont dispersées d'une manière stable est souvent l'eau, mais ce peut aussi bien être un alcool ou un autre solvant.

Un gel peut se définir comme un réseau solide tridimensionnel très ouvert, réalisé par interconnexion des particules colloïdales précédente et s'étendant au travers de la totalité du milieu liquide initial. Si le réseau solide est constitué de particules colloïdales plutôt proches de nanoparticules denses, le gel est dit colloïdal. Si les particules colloïdales sont plutôt du type macromolécules polymériques plus ou moins linéaires, le gel est appelé polymérique. Les gels peuvent aussi être classés selon le type de milieu liquide dans lequel ils ont été synthétisés. Si ce liquide est constitué majoritairement d'eau, le gel correspondant peut être appelé aquagel (ou hydrogel). Si ce liquide est largement constitué d'alcool, le gel peut être appelé alcogel.

Quand le liquide a été évacué, le matériau restant est un solide fragile et très poreux habituellement appelé xérogel ou aérogel, selon que la technique de séchage appliquée a induite un rétrécissement important ou très modéré, de ce solide.

Les gels inorganiques tels que ceux de silice offrent certains avantages : amélioration de la résistance mécanique, stabilité thermique et chimique et un non-gonflement du gel dans les solvants aqueux ou organiques. De plus la silice hydrophile est non-toxique et elle est inerte biologiquement.

Il a été montré que les enzymes encapsulées dans des gels de silice conservaient une partie, voire la totalité, de leurs propriétés physiques et leurs propriétés catalytiques. L'encapsulation dans des matériaux sol-gel est en général réalisée à température ambiante à partir d'une solution de précurseurs de silice à laquelle on ajoute la solution enzymatique (Figure 14).

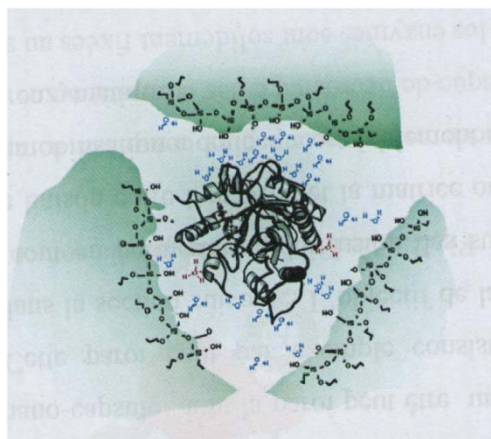


Figure 14: Vue schématique d'encapsulation d'une enzyme dans un gel de silice.

Le réseau poreux du gel de silice se construit par hydrolyse suivi de condensation des monomères du précurseur, autour des biomolécules à encapsuler qui se trouvent finalement emprisonnées au sein du gel. Les transformations biocatalytiques se font donc à l'intérieur du gel de silice après diffusion des substrats à travers les pores vers l'enzyme.

Biocapteurs sol-gel à base de tyrosinase

Le premier article rapportant l'immobilisation de tyrosinase pour l'élaboration de biocapteurs date de 1998 (Li et al., 1998). Dans ce travail, l'enzyme est immobilisée dans un film mince de silice obtenu par la voie alcoxyde, déposé sur une électrode de carbone. La détection de dérivés phénoliques (catechol, phenol, crésol,..) par voie électrochimique est réalisée et la stabilité du système conservé dans du tampon phosphate à 4°C sur 15 jours est reportée.

Plusieurs articles ont ensuite décrit des améliorations ou modifications de ces systèmes à base de silice : introduction de polymères conducteurs (Wang et al., 2000), de médiateurs (Pandey et al. 2001) et/ou de particules métalliques (Li et al., 2013). Ces additifs visent à obtenir des réseaux conducteurs afin de favoriser la détection électrochimique.

L'utilisation d'autres oxydes obtenus par voie sol-gel a aussi été reportée. L'alumine qui présente une bonne affinité pour les substrats phénoliques, a été utilisée telle quelle (Liu et al., 2000), avec un médiateur moléculaire (Liu et al. 2000) puis avec addition de carbone (Zejli et al., 2008). L'oxyde de titane, qui présente des propriétés de conduction électronique, a aussi été largement exploré, sous forme de films obtenus par voie de solution (Zhang et al., 2003) puis par voie gaz (Yu et al., 2003) pour éviter la synérèse et la fissuration liées à l'évaporation du solvant. L'ajout de nanotubes de carbone, de Nafion et/ou de particules d'or pour augmenter la conductivité des matériaux a aussi été étudié (Lee et al., 2007 ; Singh et al., 2013). Le possible effet d'espèces interférentes sur la réponse du capteur a été examinée afin de déterminer son efficacité sur des systèmes réels (Kochana et al., 2008).

Notons enfin deux études portant sur l'utilisation du ZnO comme matrice d'immobilisation (Liu et al., 2005 ; Lee et al., 2011).

Dans le cadre de notre travail, deux articles méritent plus spécifiquement d'être cités. Le premier concerne la détection de la dopamine en utilisant un composite associant une poudre de carbone, des nanoparticules de TiO₂ et un tissu de pomme contenant une PPO (Majidi et al., 2010). C'est à notre connaissance le seul exemple dans lequel un extrait enzymatique, plutôt qu'une enzyme purifiée, a été utilisé en combinaison à la voie sol-gel. Le deuxième article important rapporte la réalisation d'un biocapteur optique basé sur l'immobilisation de la tyrosinase dans un matériau silice/Nafion/chitosane, en présence de 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) (Abdullah et al., 2006). Le MBTH a comme intérêt qu'il interagit avec les produits de l'oxydation des dérivés phénoliques pour donner un composé très coloré, ce qui augmente le seuil de détection du capteur.

2.4. Des biocapteurs aux bioréacteurs

La réaction de détection des dérivés phénoliques étant basée sur leur oxydation catalysée par les PPOs, il est a priori possible d'utiliser ces enzymes immobilisées comme bioréacteurs pour la dégradation du phénol et de ces dérivés. En fait, malgré le développement de techniques reposant sur l'intégration d'enzymes, et en particulier de laccases, dans des membranes de filtration afin d'effectuer une dégradation en flux continu (Chea et al., 2012), la littérature indique que la voie cellulaire est la plus prometteuse dans ce domaine (Krastanov et al. 2013). Les travaux réalisés sur ce sujet au cours de cette thèse doivent, dans ce cadre, être considérées comme largement exploratoires et nous n'avons pas souhaité développer plus avant l'état de l'art dans ce domaine au cours de cette synthèse bibliographique, reportant le lecteur à quelques revues pour son information (Nair et al. 2008 ; Basha et al. 2010 ; Al-Khalid et El-Naas, 2012 ; Mukherjee et al. 2013).

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Chapitre 2. Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Matériels biologiques

Le champignon de couche *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach et la truffe *Terfezia leonis* sont utilisés comme source de la polyphénol oxydase (PPO) (Figures 15-16). Les champignons sont lavés à l'eau distillée pour éliminer les résidus du sol et sont séchés à température ambiante puis conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.



Figure 15: Champignon de couche *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach.



Figure 16 : La truffe *Terfezia leonis* Tul.

1.2 Produits chimiques

La L-tyrosine, le pyrogallol, le pyrocatechol et le tetraméthoxysilane (TMOS) sont fournis par Fluka. Le Ludox HS-40 est fourni par Sigma. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

2. Méthodes biochimiques

2.1 Extraction et purification partielle de la PPO d'*Agaricus bisporus*

L'extraction et la purification de la PPO de champignon de couche suit le protocole indiqué par Dawson et Magee (1955). Il comporte trois étapes principales : extraction, précipitation par l'acétone à 99.5 % et précipitation par le sulfate d'ammonium (60 % de saturation).

Etape 1. Préparation de l'extrait brut

745.5 g de champignon frais sont lavés abondamment à l'eau distillée afin d'éliminer les résidus du sol, séchés à l'air libre, découpés et broyés pendant 2 min à l'aide d'un broyeur

dans 1230 mL d'acétone préalablement refroidie à -15°C afin d'éliminer les phénols endogènes, les composés chromogènes et pour enlever l'eau (Nelson and Mason, 1970; Ben-Shalom et al., 1977; Vámos-Vigyázó, 1981).

La suspension de pulpe est filtrée à travers quatre couches de gaze et est pressée manuellement jusqu'à l'obtention d'un résidu sec dit poudre d'acétone. La pulpe pressée, pesant 93.5 g est refroidie au contact avec de la glace pendant au moins 4 heures. Elle peut être conservée par congélation pendant plusieurs mois si désiré. La pulpe froide est ensuite broyée et suspendue dans environ 960 mL d'eau distillée, puis laissée une nuit à 5°C dans un réfrigérateur. La suspension est filtrée à travers de la gaze, et la pulpe qui se dépose sur le tissu est pressée à sec manuellement.

Le filtrat obtenu (800 mL) est ensuite filtré deux fois sur le papier Whatman N°1, sous vide, à l'aide d'un filtre Büchner, pour pouvoir éliminer au maximum les particules solides restantes. Il constitue l'extrait brut.

Etape 2. Fractionnement par l'acétone (99.5%)

1200 mL d'acétone (99.5%) sont ajoutés au 800 mL d'extrait brut. Le précipité qui en résulte est filtré sur la célite. La célite offre quelques avantages lors de la purification de la PPO, car elle est susceptible de former des liaisons spécifiques avec les protéines à cuivre (Mayer et Harel, 1979). Le précipité et la pâte de célite sont mis en suspension et agités dans 252 mL d'eau distillée froide (5°C) pour redissoudre les protéines. La solution est filtrée encore une fois sur une autre pâte de célite. Le filtrat (224 mL) est placé dans un réfrigérateur à 5°C.

Etape 3. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation

103.6 g de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sont dissouts dans les 224 mL de solution froide, préparée dans l'étape 2 pour obtenir une solution à 60 % de saturation. Après agitation durant quelques mins, le mélange est filtré sur la célite. Les protéines précipitées sur la pâte sont lavées avec une solution froide de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0.35 M. Les protéines précipitées sont ensuite redissoutes par agitation dans environ 100 mL d'eau distillée froide, comme dans l'étape 2.

Les extraits enzymatiques ainsi obtenus sont divisés en petites parties dans des tubes Eppendorf et conservés à -15°C dans un réfrigérateur. On a observé que l'activité crésolase diminue après le stockage prolongé des extraits enzymatiques.

2.2 Extraction de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

50 g d'épluchures de truffes de désert (*Terfezia leonis* Tul) frais, préalablement lavées à l'eau distillée et séchées à l'air libre, sont broyées pendant 5 mins dans un mixeur contenant 100 mL tampon phosphate de sodium à pH 5.0 (0.05 M). L'homogénat obtenu est filtré à

l'aide de la gaze, puis pressé manuellement jusqu'à l'obtention d'un filtrat homogène. Le filtrat est ensuite centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 mins et le surnageant récupéré (80 mL) représente l'extrait brut de la polyphénol oxydase.

2.3 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Afin de pouvoir établir le tableau de purification et de déterminer le taux et le rendement de purification au cours des étapes d'extraction et de purification des activités enzymatiques, la quantité de protéines contenue dans chaque extrait enzymatique est dosée selon la méthode de Lowry et *al.* (1951). Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire, à partir d'une gamme étalon contenant de l'albumine sérique bovine (Figure 17).

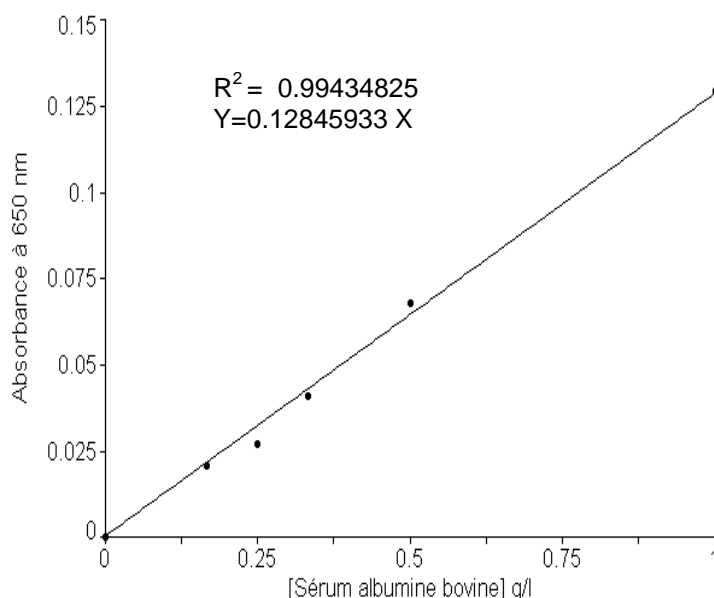


Figure 17: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et *al.* (1951).

2.4 Mesure de l'activité PPO

L'activité des polyphénol oxydases du champignon (*Agaricus bisporus*) et de truffe (*Terfezia leonis*) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOSy Spectrophotometer, England) en présence d'air en utilisant la L-tyrosine (activité cresolase) et, sauf quand indiqué, le pyrocatechol (activité catécholase) et en mesurant, respectivement, la production de la dopachrome à 475 nm ($\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Pérez-Gilabert et al., 2001) et la production de l'o-benzoquinone à 410 nm ($\epsilon = 1417 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Gouzi et al., 2012).

L'activité cresolase est mesurée avec la L-tyrosine qui est l'un des substrats endogènes principaux des champignons (vanGelder et al., 1997). Elle est déterminée à 30°C dans le

milieu réactionnel contenant 1 mL de la L-tyrosine à 1 mM dans du tampon acétate de sodium à 0.05 M et 20 µL de la solution enzymatique. La vitesse initiale de l'activité cresolase est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe d'accumulation du produit en fonction du temps après la phase de latence (Figure 18).

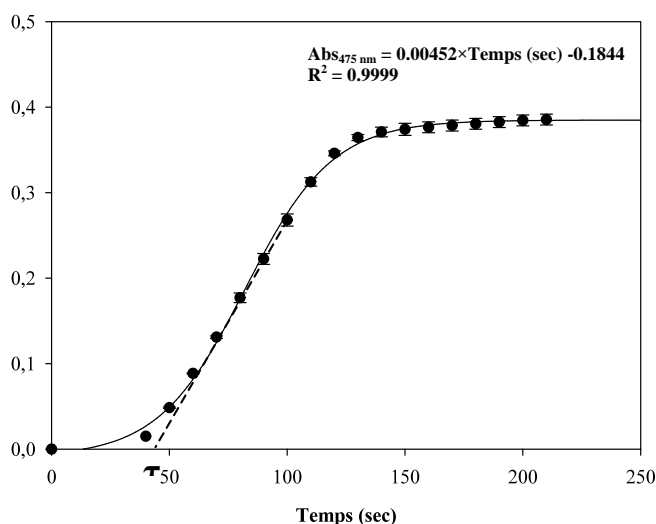


Figure 18: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* (L-tyrosine à 2 mM, SDS à 4 mM, volume de l'extrait enzymatique 20 µL, tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 mL).

L'activité catécholase est mesurée avec différents substrats, comprenant la L-dopamine ou le pyrocatechol. Elle est mesurée à 30°C dans un milieu contenant 0.2 mL de pyrocatechol à 0.1 M préparé (ou de dopamine) préparé dans l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM, 0.8 mL de tampon phosphate de sodium (pH 7.0) à 0.05 M et 10 µL de la solution d'enzyme. L'activité catecholase ne présente aucune phase de latence et la vitesse initiale est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Figure 19). Il a été confirmé que l'auto-oxydation du pyrocatechol ou de la dopamine n'interfère pas avec la mesure d'activité.

Pour les deux activités, une unité est la quantité d'enzyme qui produit 1 µmol de dopachrome ou o-benzoquinone par min à 30°C.

Pour les deux essais, la cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après pré-incubation de 5 min à 30°C. Comme indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est le constituants à ajouter le dernier dans le milieu réactionnel.

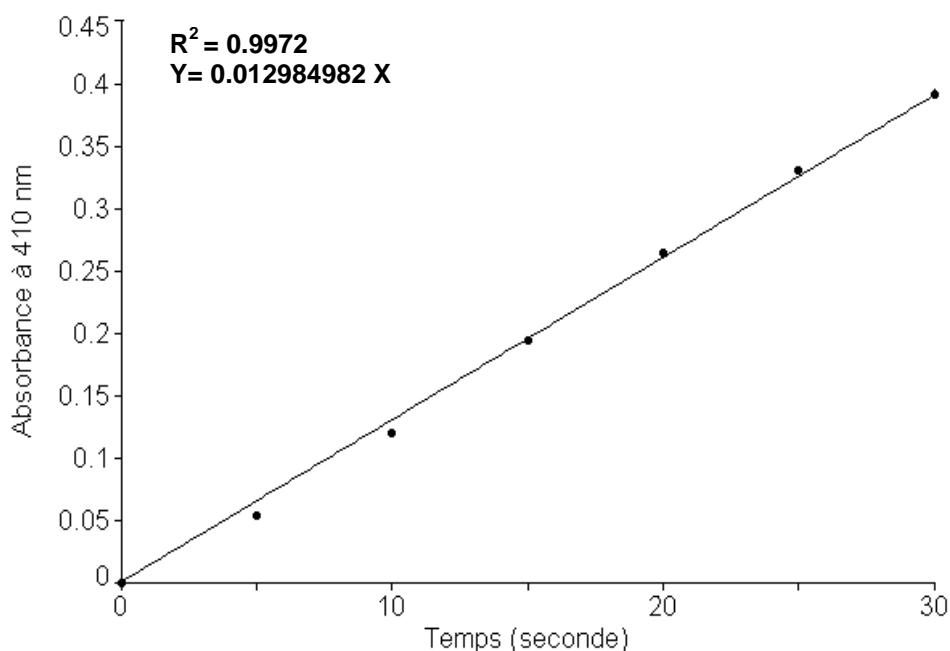


Figure 19: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO (Pyrocatechol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 5 μ l (extrait brut), tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 2 mL).

2.5 Etude de la stabilité de la PPO durant le stockage à -15°C

Les extraits enzymatiques bruts de la PPO de truffe et de champignon de Paris ont été stockés dans un réfrigérateur à -10°C et leurs activités ont été mesurées dans les conditions standards pendant 45 jours de stockage.

2.6 Détermination du pH optimal

Les effets du pH sur les activités de la PPO de truffe et de champignon de Paris sont déterminés en utilisant la tyrosine et le pyrocatechol comme substrat. Les systèmes tampon appropriés (0.05 M) sont : tampon acétate de sodium (pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate (pH 6.0-10) ajusté avec le NaOH ou le HCl à 0.05 M. A cause de la rapidité de l'autoxydation non enzymatique du substrat qui se produit à des pH élevés, la valeur limite élevée de la gamme de pH est fixé à pH 8.0 (Vámos-Vigyázó & Gajzago, 1978). Le pH optimal de l'enzyme trouvé sera utilisé dans les études ultérieures.

2.7 Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur les activités de la PPO de champignon et de truffe est testé dans les conditions standards utilisant différents volumes de l'extrait enzymatique. Les activités mesurées sont tracées en fonction du volume d'enzyme.

2.8 Etude de la spécificité de substrat

La spécificité de substrat a été déterminée par l'utilisation de cinq différents substrats potentiels de la PPO d'un grade commercial (L-tyrosine (475 nm), phénol (390 nm), pyrocatechol (410 nm), pyrogallol (420 nm), phloroglucinol (390 nm)). Les activités mono-, di- et triphénol oxydase de l'extrait brut de la PPO ont été mesurées à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.1 M) et à 30°C. La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à partir de la partie linéaire de la courbe de l'augmentation de l'absorbance en fonction du temps due à la formation des o-quinones à partir de chaque substrat.

2.9 Détermination des paramètres cinétiques

Dans le but de déterminer la constante de Michaelis-Menten (K_m), la constante d'inhibition par le substrat (K_S) et la vitesse maximale (V_{max}), les activités des PPOs d'extraits bruts du champignon de Paris et de truffe seront mesurées à 30°C, en utilisant la tyrosine et le pyrocatechol dans 50 mM de tampon au pH optimal pour chaque substrat, à différentes concentrations. Les valeurs des paramètres cinétiques, K_m , K_S et V_{max} , sont estimées par l'analyse de régression linéaire et non linéaire en utilisant les équations de Haldane (1930) et de Lineweaver-Burk (1934), respectivement. Les expressions cinétiques sont :

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_S}} \quad (\text{Equation. 1})$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{S} \cdot \left(\frac{K_m}{V_{max}} + \frac{S^2}{K_S \cdot V_{max}} \right) \quad (\text{Equation. 2})$$

Pour déterminer l'efficacité catalytique ou le pouvoir catalytique de l'enzyme, le rapport V_{max}/K_m a été calculé à partir des données obtenues à partir du graphique de Lineweaver-Burk.

2.10 Stabilité thermique

La stabilité thermique a été déterminée par le chauffage de 2 mL de l'extrait brut de la PPO de truffe ou de champignon dans des tubes en verre thermostaté dans un bain marie à différentes températures allant de 30 à 70°C pour une période de 10 min. Les solutions d'enzyme sont rapidement refroidies dans l'eau glacée, et les activités cresolase et

catécholase résiduelles sont mesurées et exprimées par rapport à l'activité maximale. La température optimale obtenue est utilisée dans les expériences suivantes.

2.11 Effet du sodium dodécyl sulfate

L'effet du SDS sur les activités crésolase et catécholase de la PPO de truffe a été étudiée en mesurant respectivement la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine à 1 mM et du pyrocatechol à 20 mM ceci pour des concentrations de SDS comprises entre 0.5 et 3.5 mM. Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes.

2.12 Effet des inhibiteurs

Pour déterminer le mécanisme d'inhibition des PPOs de truffe et du champignon de Paris par l'acide benzoïque, l'azide de sodium, et le fluorure de sodium, l'activité de la PPO a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de chaque inhibiteur et à différentes concentrations de pyrocatechol.

Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur (Arslan et Doğan, 2005). Les constantes d'inhibition (K_i et K_{is}) ont été calculées à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur, comme c'est décrit précédemment (Chen et *al.*, 1998). K_i et K_{is} représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI), respectivement. La constante d'inhibition K_i est une mesure quantitative du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs réversibles. Par conséquent, dans notre étude, l'efficacité d'un inhibiteur est exprimée par le K_i , qui est l'inverse de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur.

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC_{50}), l'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 7.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs pour une concentration constante de pyrocatechol. Les valeurs d' IC_{50} ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Chen et *al.*, 1998).

2.13 Etude de la stabilité thermique de la PPO

Les activités résiduelles de la PPO (A_t) du champignon de Paris et de la truffe ont été évaluées après incubation des tubes à hémolyse de 1 mm d'épaisseur, contenant 1 mL d'extrait enzymatique brut pendant 10 min dans un bain marie réglé à différentes températures. Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée

et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée dans les conditions expérimentales standards.

Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement (A_0) (Doğan et al., 2005) selon l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique relative (\%)} = \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100 \quad \text{Equation (3)}$$

où

A_0 : est l'activité enzymatique initiale ;

A_t : est l'activité enzymatique résiduelle à l'instant t .

2.14 Etude cinétique et thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO

Les paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) et de truffe de désert (*Terfezia leonis*) ont été déterminés par incubation des enzymes à différentes températures dénaturantes et mesure de leurs activités résiduelles à différents temps de traitement thermique.

Les analyses des données cinétiques de l'inactivation thermique de l'enzyme peuvent être décrites par la réaction d'ordre un (Râpeanu et al., 2006):

$$\frac{dA_t}{dt} = -k \cdot A_t \quad (\text{Equation. 4})$$

avec A_t est l'activité résiduelle de l'enzyme à l'instant t et k est la constante cinétique de la réaction à une température étudiée.

Pour des facteurs extrinsèque/intrinsèques constants, dans le cas d'une réaction de premier ordre, la cinétique peut être décrite par l'équation suivante :

$$\ln \left(\frac{A_t}{A_0} \right) = -k \cdot t \quad (\text{Equation. 5})$$

La constante d'inactivation thermique k peut être estimée par l'analyse de régression linéaire du logarithme naturel de l'activité résiduelle en fonction du temps.

La valeur du temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de l'activité de l'enzyme est donnée par l'expression suivante :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (\text{Equation. 6})$$

La valeur D est le temps (min) nécessaire pour réduire l'activité initiale à 90%. Elle est liée avec les valeurs de k par l'équation (7) et mathématiquement exprimée par (Espachs-Barroso et al., 2006):

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (\text{Equation. 7})$$

La valeur Z_T est la température nécessaire pour réduire la valeur D à une unité de Log (paramètre de sensibilité thermique) et elle est obtenue par la représentation des valeurs de D à l'échelle logarithmique en fonction des températures correspondantes (Stumbo, 1973).

La loi d'Arrhenius est souvent utilisée pour décrire la dépendance thermique des valeurs de k , et elle est algébriquement donnée par :

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{R.T} \quad (\text{Equation. 8})$$

avec k_0 est la constant d'Arrhenius, E_a est l'énergie d'activation (kJ.mol^{-1}), R est la constantes universelle des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T est la température absolue. L'énergie d'activation peut être estimée à partir de la pente de la l'analyse de régression linéaire du logarithme naturel de la constante de vitesse en fonction de l'inverse de la température absolue.

Les valeurs de l'énergie d'activation (E_a) et la constante d'Arrhenius (k_0) permettent de déterminer les différents paramètres thermodynamiques (Marin et al., 2003) comme la variation de l'enthalpie, de l'entropie et l'énergie libre de Gibbs, ΔH , ΔS et ΔG , respectivement, selon les expressions suivantes (Galani & Owusu Apenten, 1997):

$$\Delta G = -R.T.\ln\left(\frac{k h_P}{K_B.T}\right) \quad (\text{Equation. 9})$$

$$\Delta H = E_a - R.T \quad (\text{Equation. 10})$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (\text{Equation. 11})$$

Avec K_B est la constant de Boltzmann ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), h_P est la constant de Planck ($6.6262 \times 10^{-34} \text{ J.s}$), T est la température absolue en Kelvin (K), et k la constante cinétique d'inactivation thermique pour chaque température (s^{-1}).

2.15 Purification de la PPO de truffe de désert par la méthode partage en trois phase (Three-phase partitioning method)

Dans un flacon en verre, 25 mL de t-butanol est ajouté à 25 mL de l'extrait brut de la PPO de truffe préalablement saturé avec du sulfate d'ammonium (30%). Le flacon est agité doucement pendant une min puis incubé à température ambiante pendant une heure. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante le flacon est centrifugé à 2000 tr/min pendant 10 min. Après centrifugation on remarque l'apparition de trois phases bien distinctes: une couche supérieure et une phase organique (t-butanol) séparées par une couche intermédiaire. Cette dernière phase est la plus riche en protéines et contient la PPO. A l'aide d'une pipette pasteur on élimine soigneusement la phase organique et la phase aqueuse. La phase riche en protéine récupérée est solubilisée dans un volume de 1.5 mL de tampon acétate de sodium à pH 5.0 (0.05 M). L'extrait obtenue est partagée dans des tubes Eppendorf qui vont être stockées à -10°C.

3. Construction d'un biocapteur optique à PPO pour le dosage de la L-dopamine

3.1. Procédé d'encapsulation

Un biocapteur optique à PPO de truffe immobilisée dans le gel de silice a été construit pour le dosage de la L-dopamine en solution. Des lames en verre de microscopie (0.5×4.5 cm) ont été trempées pendant une nuit dans une solution d'acide nitrique concentré puis lavées avec de l'éthanol, de l'acétone et enfin par de l'éthanol afin enlever les traces des contaminants organiques. Les lames seront ensuite lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée puis séchées à l'aire libre.

Une solution stock de sol a été préparée par mélange de Ludox HS-40 à pH 2 (HCl 0.1 M /Ludox HS-40 (2/1: V/V) et de tetraméthoxysilane (TEOS) préhydrolysé (1/1:V/V). Dans une cuve en plastique, 1 mL de tampon tris-HCl (pH 8.6-0.05 M) contenant 2% de glycérol a été ajouté à 0.5 mL de la solution sol puis 1 mL d'extrait brut de la PPO de truffe a été ajouté à la solution. L'addition de la solution de Tris-HCl à la solution de sol augmente le pH de la solution au environ 7.0, créant ainsi un environnement favorable pour l'enzyme. La gélification de la solution se produit après 30 min approximativement.

Une couche mince de gel de silice contenant la PPO a été déposée sur la lame de verre par la méthode de « dip-coating ». La lame est ensuite placée dans un tube Eppendorph et laissée sécher à température ambiante pendant 30 min. Après l'ajout de 50 µL de tampon phosphate de sodium (pH 7.0-0.05 M), les tubes Eppendorph ont été placés à 4°C pendant une nuit.

3.2. Détermination de l'activité de la PPO immobilisée

Toutes les mesures d'absorbance ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis. Dans la plupart des cas, les lames contenant l'enzyme immobilisée ont été lavées par agitation pendant 5 min dans du tampon acétate de sodium (pH 5.6-0.05 M), ceci afin d'éliminer l'enzyme libre. La lame de verre couverte de la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice a été immergée dans une cuve en plastique contenant 2 mM de la L-dopamine préparée dans du tampon acétate de sodium (pH 5.6-0.05 M). Les lectures d'absorbance ont été enregistrées à 475 nm chaque 30 sec pendant environ 5 min tout en maintenant le milieu réactionnel sous agitation.

3.3. Relargage de la tyrosinase immobilisée

Une lame de verre sur laquelle deux couches de tyrosinase immobilisée ont été déposées a été introduite dans une cuve en quartz sans catéchol contenant 2.45 mL de tampon phosphate (pH 7.0-0.05 M) et soumise à une agitation pendant 5 min. Après récupération de la lame, 50 μ L de la L-dopamine à 0.1 M ont été ajoutés pour mesurer l'activité de l'enzyme libre.

3.4. Effet du nombre de couches de silice-PPO

La vitesse initiale d'oxydation de la L-dopamine à 2 mM a été mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 20°C avec des lames de verre à différents nombres de couches de gel de silice contenant la PPO.

3.5. Effet du pH

Des tests catalytiques ont été menés sur des lames contenant deux couches de la PPO encapsulée à température ambiante, en présence de la L-dopamine à 2 mM et ceci pour différents pH compris entre 3.6 à 9. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium 0.05 M (pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate de sodium à 0.05 M (pH 6-9).

3.6. Stabilité thermique

Des lames de verre contenant deux couches de la PPO immobilisée dans la silice sont incubées dans le tampon acétate de sodium (pH 5.6-0.05 M) pendant 10 min à différentes températures comprises entre 30°C et 65°C. L'activité résiduelle de la PPO immobilisée a été déterminée à 20 °C et à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M), en présence de la L-dopamine à 2 mM.

3.7. Détermination des paramètres cinétique de la PPO immobilisée

Pour la détermination de la constante de Michaelis-Menten (K_m) et de la vitesse maximale (V_{max}) de la PPO encapsulée dans le gel de silice, l'activité dopamine oxydase a été

mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 20°C, pour différentes concentrations de la L-dopamine comprises entre 0.06 à 4.0 mM. Les valeurs apparentes de V_{\max} et K_m ont été calculées à partir des représentations graphiques de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burk (1934).

3.7 Stabilité opérationnelle

Dans le but de tester la réutilisation de la PPO encapsulée dans la silice, l'activité d'une lame contenant deux couches d'enzyme immobilisée a été mesurée 5 fois. Après chaque mesure de l'activité de la PPO, la lame est lavée avec du tampon phosphate (pH 5.6-0.05 M).

4. Construction d'un bioréacteur à PPO pour la dégradation du phénol

4.1. Caractérisation de l'activité phénolase de la PPO soluble

4.1.1. Mesure de l'activité phénolase de la PPO soluble

La cinétique de l'oxydation du phénol (concentration $C = 2,5$ mM) par la PPO libre a été effectuée dans un Erlenmeyer (réacteur batch) de 250 mL immergé dans un bain-marie réglé à 30°C et maintenu sous agitation manuelle en continu dont le volume réactionnel est de 30 mL (1 mL de l'extrait brut de la PPO et 29 mL de solution de phénol). Des prélèvements de 1 mL sont effectués chaque minute afin de suivre l'évolution de la formation de l'o-benzoquinone suite à l'oxydation enzymatique du phénol. L'analyse se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis à une longueur d'absorption maximale de 400 nm. Un essai à blanc contenant seulement de la solution tampon phosphate (0.05 M-pH 6.0) et l'extrait enzymatique est réalisé. La vitesse initiale est estimée à partir de la partie linéaire de la courbe absorbance en fonction du temps.

4.1.2. Etude de la stabilité à -15°C

L'activité PPO des extraits brut de la PPO de champignon de Paris congelés à -15°C est déterminée chaque semaine pendant leurs stockage. Les conditions de la mesure de l'activité sont : pH 6 (tampon phosphate de sodium 0.05 M), 30°C, phénol à 2.5 mM.

4.1.3. Effet de la concentration du phénol

Dans les conditions standards (pH 6, tampon phosphate de sodium 0.05 M, 35°C), on mesure les vitesses initiales d'oxydation du phénol par la PPO libre pour des concentrations du phénol comprises entre 0.0625 et 10 mM. Le milieu réactionnel contient le phénol (29 mL) dilué dans du tampon phosphate de sodium (0.05 M) à pH 6.0 et de 1mL d'extrait enzymatique. Les paramètres cinétiques (K_m et V_{\max}) ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk (1934).

4.1.4. Effet de la concentration de l'enzyme

Dans des conditions standards (pH 6, tampon phosphate de sodium 0.05 M, 35°C, Volume du substrat 29 mL), on mesure la vitesse initiale d'oxydation ($\Delta\text{abs}_{400\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$) du phénol à 2.5 mM pour des volumes croissants d'extrait brut de la PPO de champignon de Paris compris entre 0.2 et 1 mL.

4.1.5. Effet de la température

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité phénolase de la PPO libre ; on mesure la vitesse initiale ($\Delta A_{400\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$) d'oxydation du phénol à différentes températures comprises entre 30 et 70°C dans les conditions standards (29 mL du phénol à 2.5 mM, tampon phosphate de sodium à 0.05 M-pH 6.0, 1 mL d'extrait enzymatique). L'énergie d'activation de l'enzyme est déterminée, en portant sur un graphique la variation du logarithme décimal de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la température absolue dans la mesure où la température n'entraîne pas la dénaturation de l'enzyme.

4.1.6. Stabilité thermique

Des solutions de 1.5 mL d'extrait brut de la PPO mises dans des tubes à hémolyses sont incubées dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30°C et 70°C pendant 10 mins. Les extraits enzymatiques sont ensuite transférés dans de l'eau glacée puis leurs activités enzymatiques résiduelles sont déterminées à pH 6.0 (tampon phosphate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, en utilisant le phénol à 2.5 mM.

4.1.7. Effet du pH

L'activité de la PPO est mesurée à différents pH compris entre 4 et 8. Les systèmes tampons utilisés sont : acétate de sodium (0.05M) (pH 4-5.6) et phosphate de sodium (0.05M) (pH 6.0-8.0). Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes (30°C, 1 mL d'extrait enzymatique, phénol 2.5 mM).

4.2 Caractérisation de l'activité phénolase de la PPO immobilisée

4.2.1. Immobilisation de la PPO de champignon de Paris dans le gel d'alginate de calcium

La PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) est immobilisée par inclusion dans un gel d'alginate de calcium à 2.5% selon la méthode décrite par Munjal et Sawhney (2002). 0.25 g d'alginate de sodium est dissoute dans 10 mL d'enzyme diluée 10 fois dans du tampon acétate de sodium (0.05 M-pH 6.0). La solution obtenue est mélangée à l'aide d'une spatule puis la solution d'alginate ainsi obtenue est laissée se dégazer. La solution est versée dans une seringue de 10 mL munie d'une aiguille et placée à 20 cm au dessus d'un

bécher contenant 100 mL de solution du chlorure de calcium à 0.2 M maintenu sous faible agitation. Une fois qu'une goutte de la solution d'alginate de sodium tombe dans la solution de chlorure de calcium, elle gèle formant ainsi une bille d'alginate de calcium. Les billes d'alginate formées sont rincées tous d'abord avec de l'eau distillée, puis avec du tampon acétate de sodium (0.05 M-pH 6.0) et sont mises ensuite dans une solution de CaCl_2 à 0.2 M sous faible agitation pendant 1 heure. Les billes d'alginate sont ensuite récupérées à l'aide d'un filtre, lavées avec de l'eau distillée et avec du tampon acétate de sodium (0.05 M-pH 6.0), dénombrées, puis conservées à 4°C dans une solution tampon d'acétate de sodium (0.05 M-pH 6.0).

4.2.2. Mesure de l'activité de la PPO immobilisée

La cinétique de l'oxydation du phénol à 2.5 mM par la PPO immobilisée par inclusion dans le gel d'alginate de calcium à 2.5% a été étudiée. Dans une Erlenmeyer (réacteur « batch ») de 100 mL contenant 220 billes d'alginate on ajoute 15 mL de phénol à 2.5 mM préparé dans du tampon acétate de sodium (0.05 M-pH 6.0). Le milieu réactionnel est agité manuellement en continu dans un bain-marie réglé à 30°C.

Des prélèvements de 1 mL du milieu réactionnel sont effectués chaque 2 min afin d'évaluer l'augmentation de l'absorbance à 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. L'essai à blanc contient seulement l'enzyme. La vitesse initiale est estimée à partir de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps.

4.2.3. Effet de la concentration en substrat

L'activité de la PPO immobilisée dans le gel d'alginate a été mesurée à pH 6.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C en présence de différentes concentrations du phénol comprise entre 0.5 et 10 mM. Le milieu réactionnel (15 mL) contient 220 billes d'alginate de calcium d'un diamètre moyen de 2.6 mm.

4.2.4. Effet de la concentration de l'enzyme

La vitesse initiale de l'oxydation du phénol à 2.5 mM a été mesurée à pH 6.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C en présence de billes d'alginate (diamètre moyen 2.6 mm) à différents volume croissant d'enzyme compris entre 0.25 et 2 mL/10 mL de solution d'alginate de calcium.

4.2.5 Effet de la température

La vitesse initiale d'oxydation du phénol à 2.5 mM par la PPO immobilisée dans l'alginate de calcium (diamètre moyen des billes d'alginate 2.6 mm) est mesurée à pH 6.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M) à différentes températures comprises entre 30 et 70°C.

4.2.6 Stabilité thermique

La stabilité thermique de la PPO immobilisée a été étudiée par incubation de 220 billes d'alginate de calcium (2.5%) d'un diamètre de 2.6 mm dans des tubes à hémolyse dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 et 70°C pendant 10 mins. Après le traitement thermique, les tubes à hémolyse sont ensuite refroidis dans un bécher contenant l'eau glacée et l'activité PPO résiduelle est mesurée à pH 6.0 (tampon acétate de sodium 0,05 M, 30°C) en présence de phénol à 2.5 mM.

4.2.7. Effet du pH

L'activité de la PPO immobilisée dans le gel d'alginate est mesurée à 30°C et à différents pH du milieu réactionnel compris entre 4 et 12, en présence du phénol à 2.5 mM comme substrat. Les systèmes tampons utilisés sont : acétate de sodium (0.05 M, pH 4-5.6) et phosphate de sodium (0.05 M, pH 6.0-12). Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes.

4.2.8 Effet du diamètre des billes d'alginate

La vitesse initiale d'oxydation du phénol à 2.5 mM par la PPO immobilisée a été mesurée avec des billes d'alginate de calcium (2.5 %) à différents diamètres compris entre 2.4 et 4 mm. L'activité enzymatique est mesurée à pH 6.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C. Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes.

4.2.9. Stabilité opérationnelle

Pour déterminer la stabilité opérationnelle de la PPO immobilisée, la vitesse initiale d'oxydation du phénol à 2.5 mM est déterminée après cinq cycles d'utilisation des billes d'alginate de calcium (diamètres moyen 2.6 mm). Après chaque cycle d'utilisation les billes d'alginate sont récupérées à l'aide d'un filtre, lavés à l'eau distillé puis avec le tampon acétate de sodium (0,05M-pH6). L'activité de la PPO immobilisée est mesurée à pH 6.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 35°C. L'activité des billes d'alginate fraîchement préparées du premier cycle d'utilisation représente 100%.

5. Analyse des résultats expérimentaux

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques

observées a été effectué par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D™ (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics Pro™ Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

Chapitre 3. Extraction, Purification Partielle et
Caractérisation de la PPO du Champignon de
Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach)

(2 publications internationales)

Chapitre 3. Extraction, Purification Partielle et Caractérisation de la PPO du Champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach)

1. Extraction et purification partielle de la PPO du champignon de Paris

L'extraction de la polphénol oxydase (PPO) à partir du champignon de Paris, nécessite la préparation d'une poudre acétonique (Anderson, 1968). Cette technique classique présente l'avantage d'éliminer l'eau, les pigments et les phénols endogènes solubles dans l'acétone, tout en conservant l'activité PPO (Nelson et Mason, 1970; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mari, 1998). La poudre d'acétone est obtenue après plusieurs lavages dans de l'acétone à 99.5%. C'est une matière première concentrée en protéine facile à stocker et d'une utilisation aisée pour l'extraction (Ben-Shalom et *al.*, 1977 ; Mari, 1998).

Dans l'extrait brut et partiellement purifié, nous avons constaté la présence de deux activités enzymatiques, crésolase et catécholase, lorsque la L-tyrosine et le pyrogallol ont été utilisés comme substrats. Ces deux activités enzymatiques sont portées par la même protéine. Elles peuvent être appelée selon les auteurs, polyphénol oxydase (PPO) ou encore tyrosinase (Mari, 1998 ; Palmer, 1963). Vanni et *al.* (1990) ont signalé, la présence de deux sites actifs sur la PPO du champignon pour les activités catécholase et crésolase, l'activité crésolase étant très faible par rapport à l'activité catécholase. Le problème majeur reste sa stabilité (Mari, 1998). Cette activité présente un temps de latence de quelques minutes avant d'atteindre la vitesse de l'état stationnaire (Nuñez-Delicado et *al.*, 1996). Ce qui pourrait expliquer le peu de travaux concernant cette activité enzymatique (Espin et *al.*, 1997). L'enzyme obtenue à partir du champignon de Paris sera donc une tyrosinase vraie car elle possède les deux activités, diphénolase et monophénolase, activités démontrés en 1962 par Smith et Krueger. Il est intéressant de remarquer que d'autres préparations de la PPO obtenues à partir d'autres sources d'origine végétale sont dépourvues d'activité crésolase (Rivas et Whitaker, 1973; Vámos-Vigyázó, 1981; Mayer et Harel, 1991; Yue-Ming et *al.*, 1997; Eidhin et *al.*, 2006 ; Gawlik-Dziki et *al.*, 2007), qui est souvent perdue au cours des étapes de purification. Des traitements doux sont requis pour pouvoir l'extraire et la préserver (Espin et *al.*, 1995).

Le Tableau 1 présente les rendements et taux de purification au cours du procédé de purification partielle de l'activité PPO de 745.5 g du champignon de Paris. Ce procédé comprend principalement suite à l'extraction : une précipitation par l'acétone suivie d'un fractionnement au sulfate d'ammonium (60% de saturation). De bons résultats ont été obtenus en termes de rendement d'activité enzymatique et du taux de purification. L'extrait

obtenu après fractionnement au sulfate d'ammonium (60% de saturation), possède les activités catécholase et crésolase les plus élevées.

L'extrait brut du champignon de Paris, contient une enzyme capable d'oxyder la L-tyrosine et le pyrogallol comme substrats. D'après Adnan et *al.* (1986), la précipitation par l'acétone a été souvent employée dans les étapes d'extraction et de purification de la PPO. L'extrait brut de la PPO du champignon de Paris a été soumis à une précipitation par l'acétone afin d'éliminer les substances pectiques provenant des tissus du champignon (Vámos-Vigyázó, 1981). L'extrait enzymatique ainsi obtenu a subi une seconde précipitation au sulfate d'ammonium à 60% de saturation, afin de concentrer l'enzyme et d'éliminer l'acétone, les protéines inactives et les sucres de poids moléculaire élevé (Mayer et Harel, 1979 ; Loncle, 1992 ; Xu et *al.*, 2004). Durant ces deux étapes de purification, l'emploi de la célite comme support de filtration s'est avéré très utile pour récupérer l'enzyme par adsorption sélective (Mathew et Parpia, 1971 ; Soysal et Söylemez, 2004; Khan et *al.*, 2006).

Après le fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation, 30% de l'activité enzymatique est retenue accompagnée d'une élimination de 86.3% de protéine. Remarquons qu'une grande partie de l'enzyme (70%) est perdue durant les étapes de sa purification. Ceci peut être expliqué par l'élimination de différents isoformes d'enzyme (Marri et *al.*, 2003). Par comparaison avec l'extrait brut, un taux de purification d'environ 2 fois est obtenu pour les deux activités (Tableau 4). Dans le cas de la PPO de champignon de Paris, 99 % de l'enzyme semble être présent à l'état de latence (Van Gelder et *al.*, 1997). L'augmentation de l'activité spécifique après le fractionnement au sulfate d'ammonium à 60 % peut donc être attribuée à l'élimination des inhibiteurs endogènes ou également à l'activation de l'enzyme latente par ce traitement (Golbeck et Cammarata, 1981; Sanchez-Ferrer et *al.*, 1989 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Steffens et *al.*, 1998). Plusieurs auteurs ont trouvé des taux de purification compris entre 1.44 et 8-fois pour la PPO des différentes sources purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium (Erat et *al.*, 2006 ; Neves et Da Silva, 2007; Gawlik-Dziki et *al.*, 2008; Gao et *al.*, 2009 ; Jiang, 1999 ; Önez et *al.*, 2008 ; Yağar, 2004 ; Sojo et *al.*, 1998; Ziyen et Pekyardimci, 2004 ; Yağar et Sağiroğlu, 2002; Yemenicioğlu, 2002 ; Frieden et Ottesen, 1959; Yang et *al.*, 2000; Cho et Ahn, 1999a; Park et *al.*, 1980; Socerhall et Soderhall, 1989; Zawistowski et *al.*, 1988; Wisemann et Montgomery, 1985 ; Dawson et Magee, 1955).

Nous avons également constaté que l'activité spécifique catécholase des extraits enzymatiques bruts et partiellement purifiés est de loin plus élevée que l'activité spécifique crésolase. Constatation confirmée par, Jolivet et *al.* en 1998 et Zyněk et *al.* en 2010. Le rapport de l'activité catécholase sur l'activité crésolase diminue au cours de la précipitation de la PPO par le sulfate d'ammonium. Ceci peut être dû à la conversion des formes *Met-* et *Dexoy*-PPO en forme *Oxy*-PPO (Ikehata et Nicell, 2000). D'après Vaughn et Duke (1984), la

PPO a normalement un taux d'activité diphénolasique très élevé par rapport à l'activité monophénolasique. Selon Smith et Krueger (1962) le rapport de l'activité catécholase sur l'activité crésolase se situe entre 10:1 à 80:1. La valeur du rapport entre ces deux activités dépend d'une part de la source d'obtention de l'enzyme et de sa méthode de purification (Bonner, 1956; Smith et Krueger, 1962 ; Bouchilloux et *al.*, 1963).

Tableau 4: Tableau récapitulatif de la purification partielle de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach
(Valeurs obtenues à partir de 745.5 g de champignon de Paris).

Etapas de purification	Volume total (ml)	Activité enzymatique totale (UE)		Protéines totales (mg) ^{***}	Activité spécifique (UE/mg)		Rendement (%)			Taux de purification (n-fois)		Rapport Cat/Cre
		Cre*	Cat**		Cre	Cat	Protéines	Cre	Cat	Cre	Cat	
Extrait brut	800	1.40	93.4	3560	0.31	21.0	100	100	100	1	1	67
Précipitation par l'acétone à 99.5%	224	2.04	129.7	703	0.65	41.3	19.75	40.8	38.9	2.1	1.97	63
Précipitation par le sulfate d'ammonium à 90% de saturation	103	3.35	189.3	487	0.71	40.1	13.70	30.8	26.1	2.3	1.91	56

*1 Unité d'activité crésolase = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 475 nm/min.ml d'enzyme.

**1 Unité d'activité catécholase = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 420 nm/min.ml d'enzyme.

***La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Lowry et *al.* (1951).

Nos activités enzymatiques catécholase et crésolase sont respectivement, 189.3 et 3.35 UE/ml. Nous avons observés la présence d'une activité laccase négligeable. Elle représente à peine 0.22% de l'activité totale de la PPO.

L'activité enzymatique totale de notre extrait brut, est plus élevée que celles mentionnées dans la littérature (Gawlik-Dziki et *al.*, 2007 ; Yue-Ming et *al.*, 1997 ; Eidhin et *al.*, 2006; Hasegawa et Maier, 1980; Önez et *al.*, 2008; Ylostalo et *al.*, 2001; Fan and Flurkey, 2004). Aussi, l'activité catécholase demeure stable pendant plusieurs semaines lorsque l'extrait enzymatique été conservé à -15°C (Figure 20), à l'inverse de l'activité crésolase. Sharma et *al.* (2003) ont constaté que la PPO du champignon reste stable pendant 28 jours lorsqu'elle est placée entre -10 et 10°C.

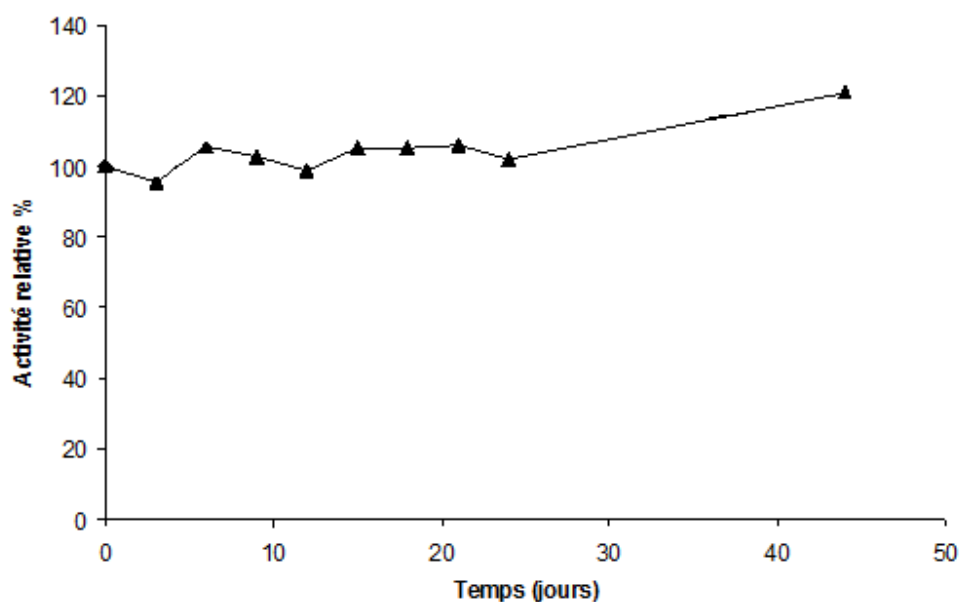


Figure 20: Stabilité de l'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris durant le stockage à -15°C.

Le champignon de Paris peut donc être considéré comme étant une source naturelle très intéressante et bon marché de la PPO (Seo et *al.*, 2003).

2 Caractérisation biochimique de la PPO du champignon de Paris

2.1 Effet du pH

Les valeurs de l'activité PPO mesurée aux pH supérieurs à 7 ont été corrigées à cause de l'autoxydation du pyrogallol en purpurogalline et du pycatéchol en o-benzoquinone qui ont lieu en milieu basique et en présence d'oxygène moléculaire (Palmer, 1963, Abrash et *al.*, 1989).

Les Figures 21 et 22 montrent l'effet du pH sur l'activité PPO du champignon de Paris, en utilisant deux substrats phénoliques (pyrocatechol 20 mM et pyrogallol 20 mM). On remarque que l'activité PPO est considérablement affectée par le changement de pH du milieu réactionnel. L'activité o-diphénol oxydase du champignon de Paris est maximale à pH 7 et 7.5 respectivement, pour le pyrogallol et le pyrocatechol. De part et d'autre de ces deux valeurs de pH l'activité enzymatique diminue à cause du changement du degré d'ionisation des groupements localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme qui sont impliqués dans la fixation et/ou la transformation des substrats (Khatun et *al.*, 2001).

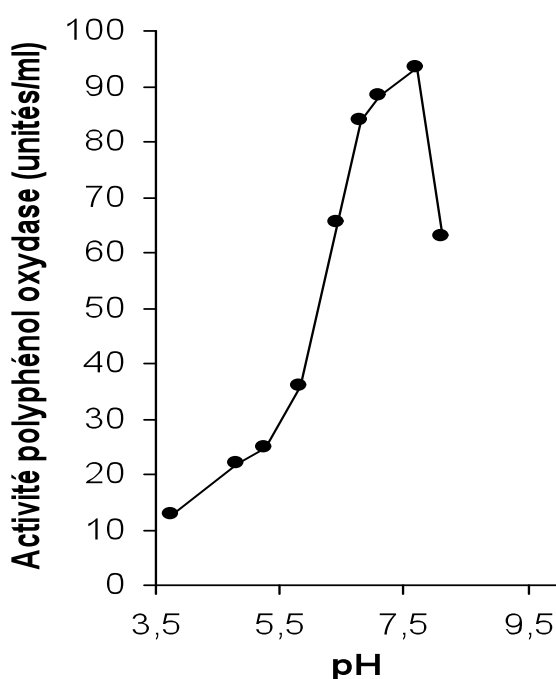


Figure 21: Activité PPO du champignon de Paris vis-à-vis du pyrocatechol comme substrat. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrocatechol et 5 μ L de l'extrait brut de la PPO.

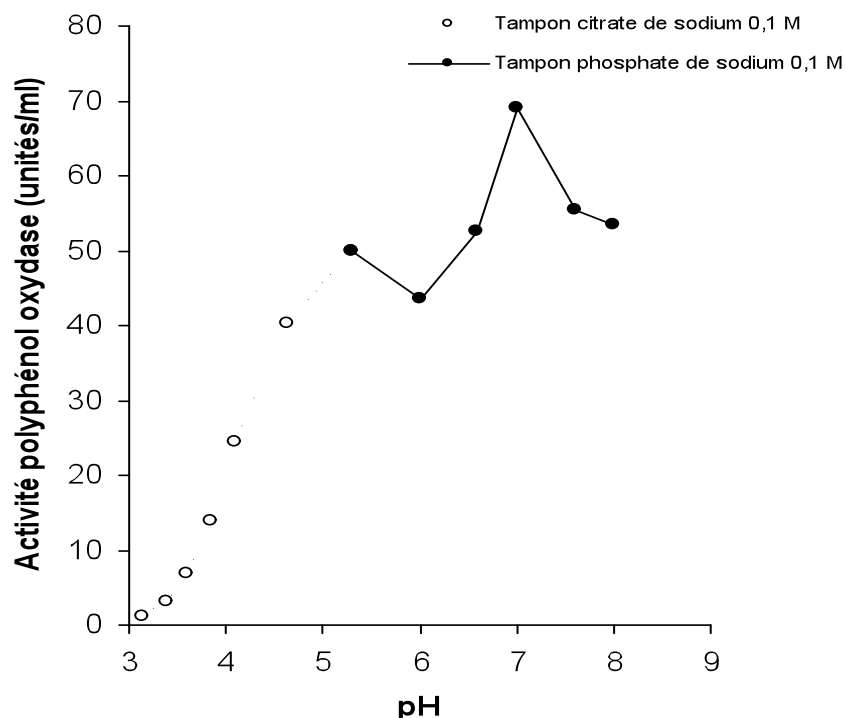


Figure 22: Activité PPO du champignon de Paris vis-à-vis du pyrogallol comme substrat. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrogallol et 5 μ L de l'extrait brut de la PPO.

L'activité PPO était également optimale à pH 5.3, lorsque le pyrogallol a été utilisé comme substrat. Ceci est un indicateur probablement de l'existence des isoformes de la PPO dans l'extrait brut (Van Gelder et *al.*, 1997).

Selon Vámos-Vigyázó (1981) la plupart des préparations enzymatiques ont un seul pH optimum. Un deuxième optimum observé dans certains cas est dû à une purification insuffisante de l'enzyme. Patil et Zucker (1965) suggèrent que l'activité optimale observée à pH 5.3 est liée à l'ionisation des résidus histidines de la PPO plutôt qu'à l'ionisation du substrat. D'autres chercheurs ont trouvé l'existence de deux pH optimaux pour la PPO, un au alentour de pH 7.0, l'autre autour du pH 5.0 (Harel et *al.*, 1964; Stelzig et *al.*, 1972). Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003). Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et *al.*, 2006). Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimal (Vámos-Vigyázó, 1981).

2.2 Spécificité de substrat

Les résultats de l'étude de la spécificité de substrat de l'extrait brut de la PPO sont représentés dans le Tableau 4. Sur les substrats potentiels testés, seuls le pyrocatechol et le pyrogallol ont été oxydés activement par la PPO.

Une faible activité PPO a été observée avec la L-tyrosine et le phénol. Ces résultats suggèrent que la PPO possède les activités mono-, di- et triphénol oxydases. L'activité enzymatique mesurée en présence du phloroglucinol provient de l'existence d'une laccase dans l'extrait brut de la PPO (Flurkey, 2002). Nous avons remarqué que l'oxydation des composés monophénoliques est caractérisée par une phase de latence, suivie d'une vitesse initiale de la réaction jusqu'à l'état stationnaire.

Tableau 5: Spécificité de substrat de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Substrat	Activité enzymatique relative au pyrocatechol (%)
<i>Monophénols</i>	
L-tyrosine (2 mM)	0.7
Phénol (10 mM)	0.5
<i>Diphénol</i>	
Pyrocatechol (10 mM)	100
<i>Triphénols</i>	
Pyrogallol (10 mM)	43.5
Phloroglucinol (10 mM)	0.3

2.3 Détermination des paramètres cinétiques

L'effet de la nature du substrat et de sa concentration sur l'o-diphénol oxydase du champignon de Paris a été étudié en utilisant le pyrocatechol et le pyrogallol à des concentrations comprises entre 0.2 et 50 mM. Les autres paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon phosphate 0.05 M ; pH 7.0 ; 30°C).

Nos résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide des équations de Haldane et de Lineweaver-Burk. D'après les valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R^2), l'oxydation du pyrocatechol et du pyrogallol par la PPO du champignon de Paris suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat.

Sur la Figure 23 est indiquée la vitesse initiale en fonction de la concentration des deux substrats utilisés. On constate que l'activité o-diphénol oxydase augmente jusqu'à 10 et 20 mM de pyrogallol et pyrocatechol, respectivement. Au-delà de ces deux concentrations saturantes, on assiste à une diminution d'activité PPO.

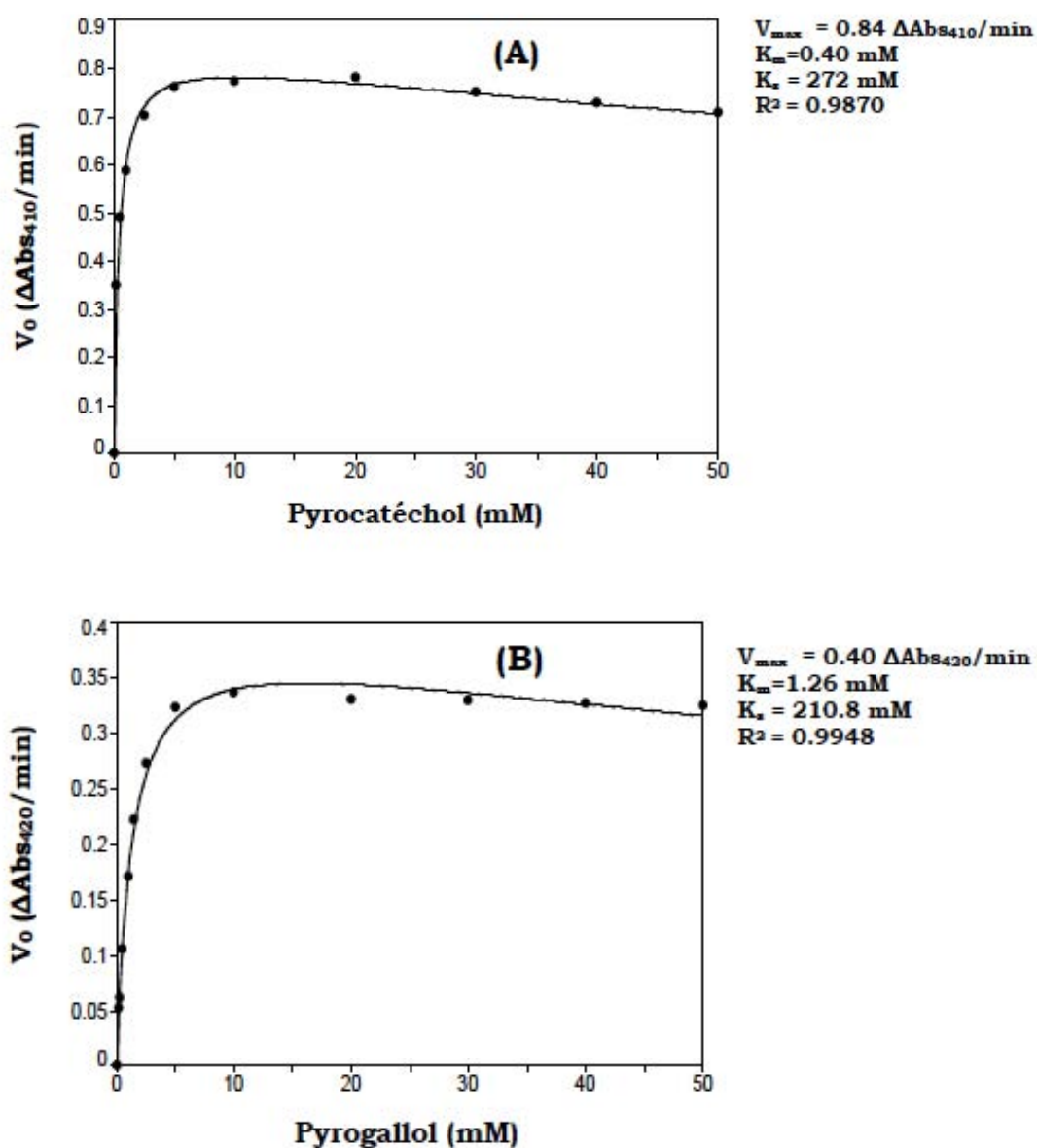


Figure 23: Représentation graphique de Haldane de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité o-diphénol oxydase du champignon de Paris (30°C - tampon phosphate pH 7.0 et 0.1 M - extrait enzymatique brut 5 μL - volume du milieu réactionnel 2.05 ml): (A) Pyrocatechol, (B) Pyrogallol.

La raison de cette diminution, est liée au phénomène d'inhibition par excès de substrat (Mayberry et Mallette, 1962; Palmer, 1963; Duckworth et Coleman, 1970 ; Varoquaux, 1978). Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction et, parfois, à la compétition entre le produit et le substrat (Palmer, 1985 ; Macrae et

Duggleby, 1968). L'inhibition de l'enzyme par le substrat à concentrations élevées a été observée pour la PPO de différentes sources végétales. Deux hypothèses sont émises :

1- On suppose qu'à des concentrations élevées de substrat, le complexe actif enzyme-substrat (ES) et le complexe ternaire inactif (ESS) sont formés simultanément.

2- On suggère qu'une deuxième molécule de substrat peut se lier inefficacement près du site actif de l'enzyme, retardant ainsi son action catalytique (Zawistowski et *al.*, 1991; Palmer, 1985).

Haldane (1930) a proposé une théorie très simple pour expliquer ce phénomène. Il suppose que l'enzyme possède au moins deux sites actifs successifs et voisins, ce qui implique le passage du substrat par au moins un état transitoire. Cette théorie a été soutenue par Ludwig et Nelson (1939), pour expliquer l'inactivation de l'enzyme. En présence d'un excès de substrat, deux molécules de pyrocatechol ou de pyrogallol vont se fixer simultanément sur les deux sites actifs de l'enzyme, empêchant ainsi l'orientation nécessaire à la réaction catalytique (Varoquaux, 1978). L'oxygène semble jouer un rôle actif dans cette inhibition. Duckworth et Coleman (1970) ont démontré que l'inhibition par excès de pyrocatechol, de la catécholase du champignon était d'autant plus marquée que la teneur en oxygène dissous dans le milieu réactionnel était faible.

Le Tableau 6 regroupe les valeurs des paramètres cinétiques (V_{\max} , K_m et K_s) de la PPO calculés à partir de la régression non linéaire de Lineweaver-Burk (1934) (Figure 24). Le V_{\max} et K_m de la PPO sont respectivement 168 UE/min/ml et 0.4 mM, pour le pyrocatechol et 80 UE/min/ml et 1.40 mM, pour le pyrogallol.

Tableau 6: Valeurs des constantes cinétiques (V_{\max} , K_m et K_s) apparentes et efficacité catalytique de substrat vis-à-vis de l'activité o-diphénol oxydase de la PPO du champignon de Paris (tampon phosphate 0.1 M-pH 7.0 ; 30°C).

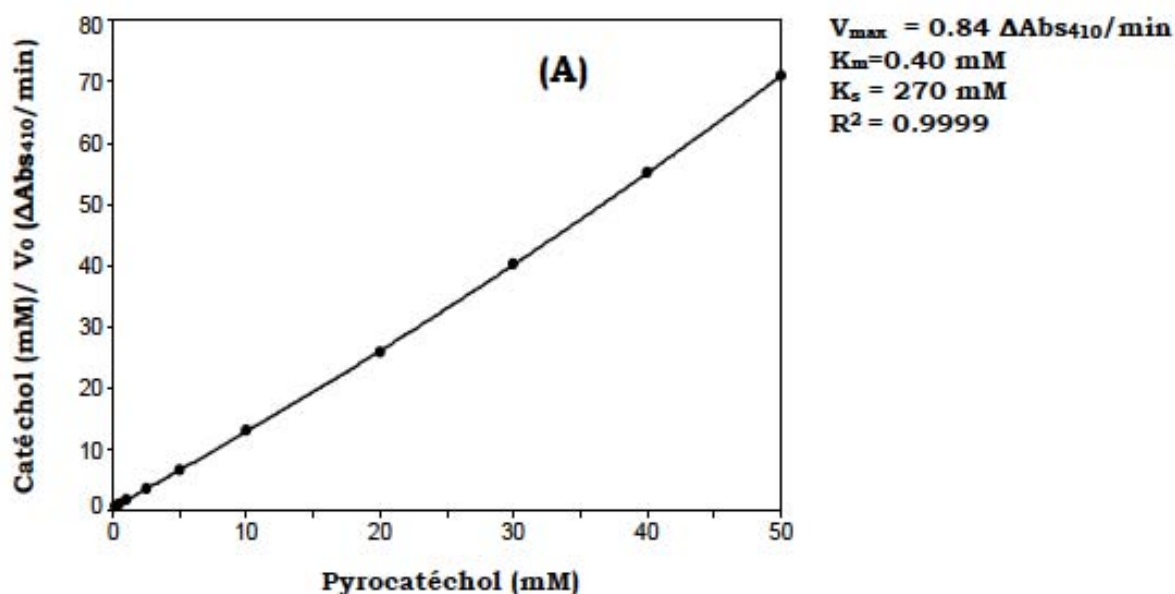
Substrat	Longueur d'onde (nm)	V_{\max} (Δ Abs/min)	K_m (mM)	K_s (mM)	Efficacité catalytique (V_{\max}/K_m ; Δ Abs/min.mM)
Pyrocatechol	410	0.84	0.40	270	2.10
Pyrogallol	420	0.40	1.40	250	0.28

Il est bien connu que les valeurs de K_m et V_{\max} de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arslan et *al.*, 1997 ; Dogan et Dogan,

2003; Ziyen et Pekyardimci, 2004). Dogan et al. (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du K_m .

La valeur de K_m obtenue pour le pyrocatechol à pH 7.0 est du même ordre de grandeur que celles trouvées par García-Molina et al. (2005) (0.3 mM) ; Selinheimo et al. (2009) (0.25 mM) et Rodakiewicz-Nowak et al. (2002) (0.39 mM) avec la catécholase du champignon *Agaricus bisporus*. García-Molina et al. (2005) ont trouvé un K_m de 2.16 mM pour l'*o*-diphénol oxydase du champignon *Agaricus bisporus* utilisant le pyrogallol comme substrat. Palma-Orozco et al. (2011) ont trouvé un résultat analogue pour la PPO de la sapote (*Pouteria sapota*) (1.3 mM). Les autres valeurs de la constante d'affinité K_m , de la PPO pour le pyrocatechol rapportées par la littérature sont : 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Aydemir, 2010), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (Dogan et al., 2005); 5.55 mM pour la PPO de la poire (*Pyrus communis*) (Ziyen et pekyardimci, 2004), 4.5 mM pour la PPO du coing (Yağar et Sağiroğlu, 2002), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighia glabra* L.) (Kumar et al., 2008), 6.3 mM pour la PPO de la mangue (*Mangifera indica* L.) (Wang et al., 2007), 3.65 mM pour la PPO du raisin (*Vitis vinifera* L.) (Önez et al., 2008) et 8.3 mM pour la PPO de céleri (*Apium graveolens* L.).

Les valeurs de K_m trouvées pour la PPO avec le pyrogallol comme substrat sont : le céleri 4.5 mM (Yağar, 2004); le tournesol (*Helianthus annuus*) 1.01 à 1.96 mM (Singh et al., 1999); la poire (*Pyrus communis*) 29 mM (Ziyen et Pekyardimci, 2004), l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) 5.2 mM (Doğan et al., 2005), et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 20 mM (Aydemir, 2010).



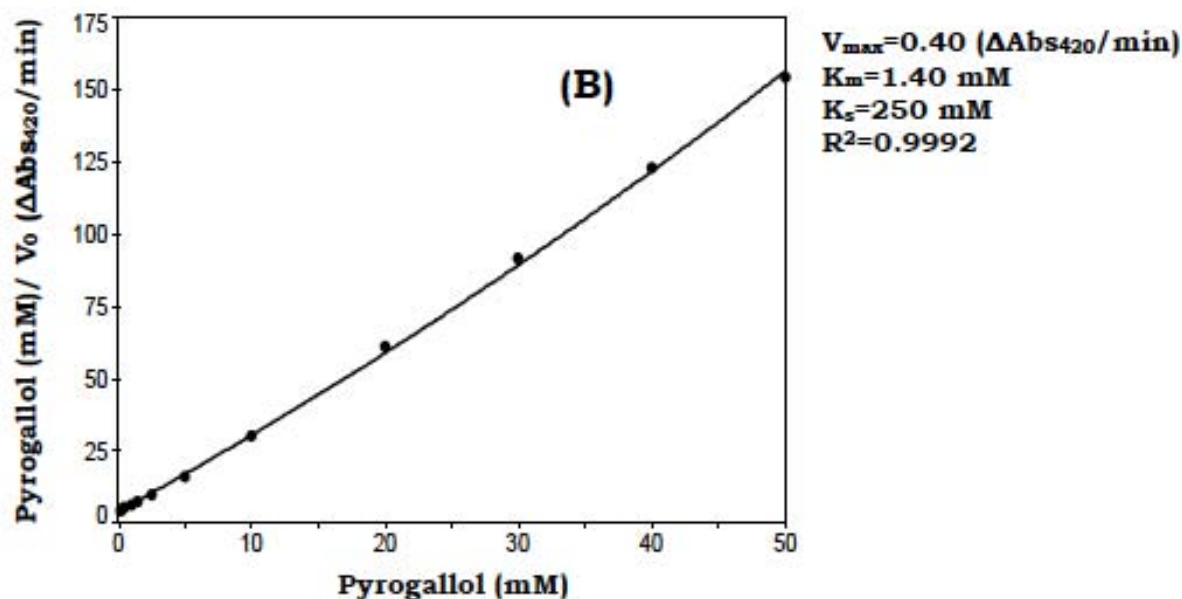


Figure 24: Représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934) de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité o-diphénol oxydase du champignon de Paris (30°C-tampon phosphate pH 7.0 et 0.1 M-extrait enzymatique brut 5 µl-volume du milieu réactionnel 2.05 ml): (A) Pyrocatechol, (B) Pyrogallol.

En termes d'efficacité catalytique ou efficacité physiologique (V_{\max}/K_m), le pyrocatechol semble être le meilleur substrat pour la PPO du champignon de Paris *Agaricus bisporus*, (Rocha et al., 1998 ; Yağar, 2004; Dagan et al., 2002 ; Dincer et al., 2002; Wang et al., 2007).

2.4 Effet de la concentration de l'enzyme

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la PPO dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en substrat, soit 20 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 0 à 6.5 µl par 2 ml de volume réactionnel.

La Figure 25 représente l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du pyrogallol par la PPO du champignon de Paris en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans cette expérience, le volume de 5 µL d'extrait enzymatique est convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

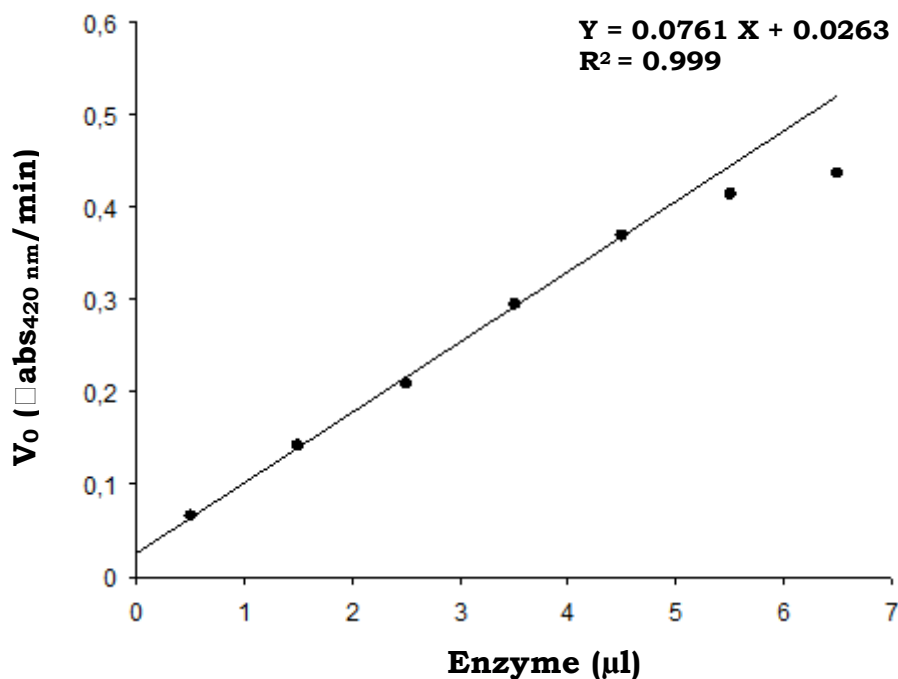


Figure 25: Vitesse initiale de l'oxydation du pyrogallol en fonction de la concentration de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

2.5 Stabilité thermique

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de la PPO du champignon de Paris, sont représentés dans la Figure 26. La représentation graphique de l'activité o-diphénol oxydase résiduelle, exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique relative à 30°C pour les différentes températures testées, montre que l'enzyme n'est pas stable thermiquement à des températures supérieures à 35°C. De 35 à 45°C, l'activité enzymatique résiduelle diminue légèrement (17%).

Une inactivation rapide se produit à entre 45 et 55°C. Cette baisse d'activité enzymatique, selon Khatun et *al.* (2001), Yemenicioğlu (2002) et Doğan et *al.* (2005b) est due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif et/ou à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont certaines sont extrêmement thermolabiles. Il est également probable que le chauffage doux cause la dissociation de quelques formes oligomères de la PPO vers des monomères moins actifs (Yemenicioğlu, 2002).

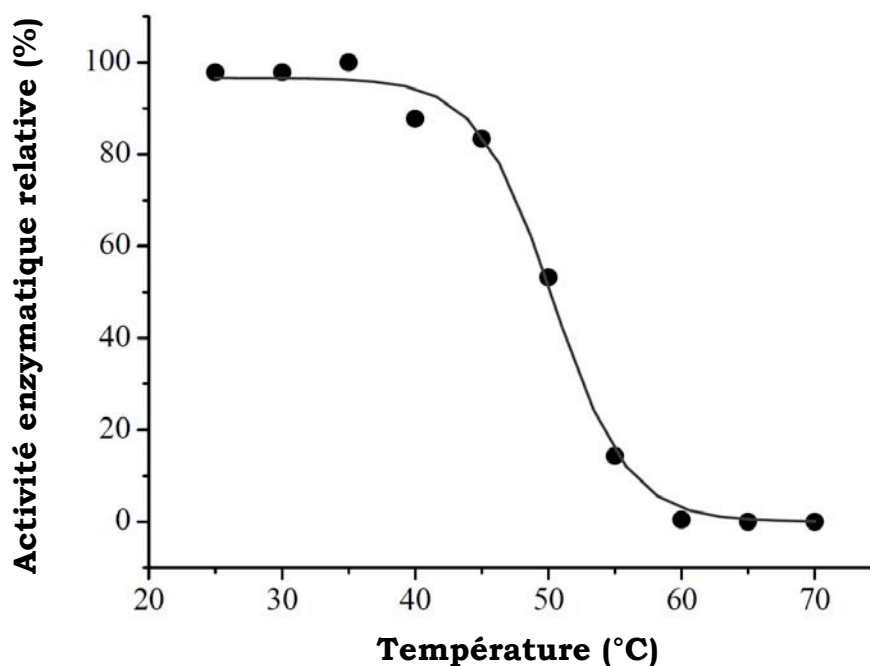


Figure 26: Stabilité thermique de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) après 30 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrocatechol dans 0.1 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.

Notons aussi que la PPO est complètement inactivée à 70°C. Ces propriétés enzymatiques sont similaires avec ceux trouvées pour la PPO des espèces : *Penaeus japonicus* (Benjakul et al., 2005), *Macrolepiota mastoidea* (Kolcuoğlu et al., 2006), *Musa cavendishii* (Ünal, 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al., 2005a) et *Castanea henryi* (Xu et al., 2004). De façon générale, la PPO est considérée comme étant une enzyme non thermostable (Amiot et al., 1987).

3. Etude de l'inactivation thermique de l'activité catécholase

3.1. Etude cinétique

En se basant sur les résultats de l'étude de la stabilité thermique, une étude cinétique de l'inactivation thermique de l'activité catécholase du champignon de Paris détaillée a été entreprise, à pression atmosphérique dans l'intervalle des températures compris entre 45 et 73°C.

Après traitement thermique des extraits bruts de la PPO, l'activité enzymatique résiduelle a été mesurée dans les conditions optimales suivantes : pyrocatechol 10 mM et pH 7.0 dans tampon phosphate de sodium 0.05 M. La figure 27 montre les résultats de l'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris. On constate que l'ampleur de la dénaturation de l'activité catécholase, augmente simultanément avec la température et le temps du traitement, et que l'activité enzymatique diminue de manière exponentielle avec le temps.

Selon Patnaik (2002), l'inactivation thermique de la PPO dépend non seulement de la température mais, dépend aussi, du temps d'incubation de l'enzyme. On remarque que l'incubation de l'enzyme à 45°C pendant 30 min, n'a pas causé une perte significative de son activité initiale. Par contre, elle augmente rapidement au-dessus de 55°C. L'activité enzymatique à cette température, est réduite approximativement de 40%. Au-dessus de 60°C, l'inactivation thermique de la PPO devient trop rapide. Les temps nécessaires pour une inactivation de 50% de l'activité enzymatique à 60 et 65°C sont respectivement 11 et 1.1 min. Elle a été presque complètement inactivée après 6 min d'incubation à 70°C (0.075%).

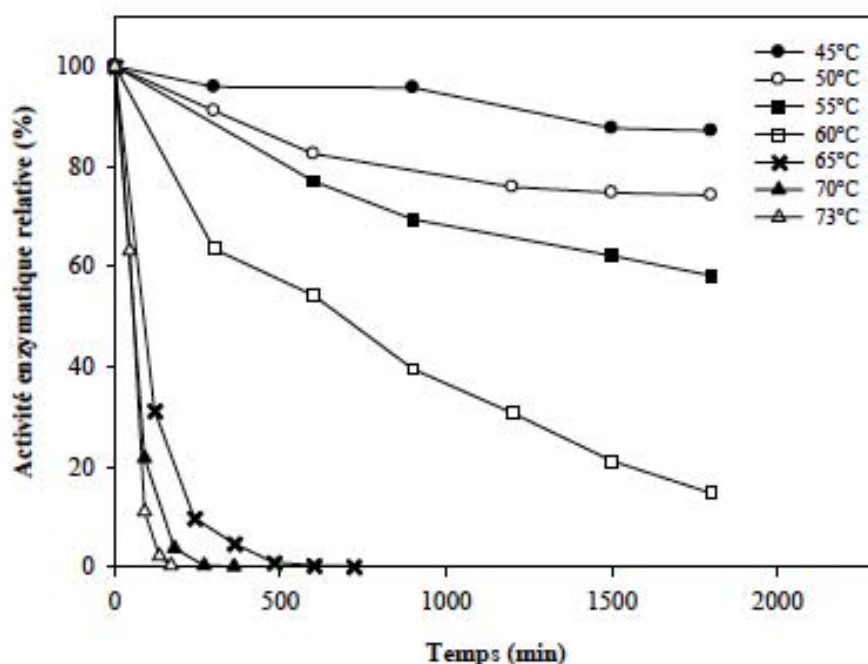


Figure 27: Effet de la température et du temps de traitement thermique sur l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). L'activité enzymatique résiduelle est mesurée en présence de pyrocatechol 10 mM, à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) à 30°C.

La figure 28 représente les courbes semi-logarithmiques de l'activité résiduelle de la PPO du champignon de Paris (A_t/A_0) en fonction du temps de traitement thermique. Toutes les courbes sont linéaires en fonction des températures étudiées conformément au processus d'inactivation du premier ordre (Fortea et *al.*, 2009). Leurs pentes représentent les constantes de vitesse d'inactivation (k). Elles ont été calculées à partir de l'équation de régression linéaire suivante, (Anthon et Barrett, 2002; Râpeanu et *al.*, 2006; Samborska, 2007):

$$\log \left(\frac{A_t}{A_0} \right) = \left(-\frac{k}{2.303} \right) \times t \quad \text{Equation (12)}$$

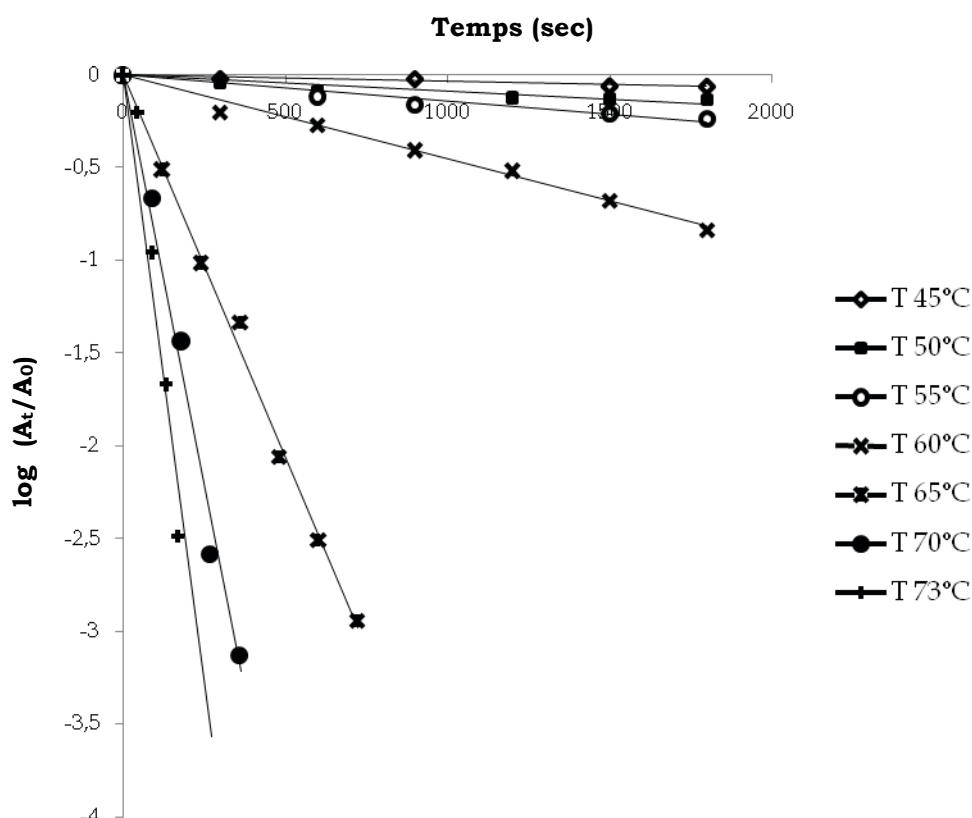


Figure 28: Détermination des constantes de vitesse d'inactivation thermique (k) de la PPO du champignon de Paris à différentes températures.

Pour mieux décrire les cinétiques d'inactivation thermique des réactions du premier ordre, le modèle TDT (Thermal Death Time concept) a été utilisé pour déterminer les valeurs D et Z (Van Loey et *al.*, 1997). La valeur D est définie comme étant le temps nécessaire à une certaine température, pour réduire l'activité enzymatique initiale (A_0) à 90% ou d'une unité logarithmique. Pour les réactions du premier ordre, la valeur D est inversement proportionnelle à la constante de vitesse d'inactivation (k). Par conséquent, le temps de réduction décimale D a été estimé à partir de la pente de la régression linéaire du $\log (A_t/A_0)$ en fonction du temps selon l'équation suivante (Samborska, 2007):

$$\log \left(\frac{A_t}{A_0} \right) = \left(-\frac{1}{D} \right) \times t \quad \text{Equation (13)}$$

Z (°C) est l'augmentation de la température nécessaire pour une réduction de 90% de la valeur D (paramètre de sensibilité à la température). Il suit l'équation (Gnangui et *al.*, 2009):

$$\log \left(\frac{D_1}{D_2} \right) = \left(\frac{T_2 - T_1}{Z_T} \right) \quad \text{Equation (14)}$$

avec :

T_1 et T_2 représentant respectivement la température la plus faible et la plus élevée, °C ou °K.
 D_1 et D_2 sont les valeurs de D aux températures faible et élevée en minute.

La valeur Z_T ainsi que le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) sont déterminés à partir de la régression linéaire du log D en fonction de la température (T).

Les valeurs des paramètres cinétiques (k , D et $t_{1/2}$) d'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris, ainsi calculés sont regroupées dans le Tableau (4).

Tableau 7: Les paramètres cinétiques estimés de l'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Température (°C)	D (min)	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	R ²
45	491.06	0.004690	147.7925	0.9135
50	195.41	0.011785	58.816	0.8461
55	117.58	0.019586	35.3899	0.9359
60	36.82	0.062547	11.082	0.9896
65	4.05	0.568642	1.2189	0.9954
70	1.89	1.218518	0.5688	0.9875
73	1.28	1.799218	0.3852	0.9348

Le $t_{1/2}$ et D sont deux paramètres importants. Ils sont souvent utilisés pour caractériser la stabilité d'une enzyme (Ünal et Şener, 2006 ; Marangoni, 2003). Le Tableau 7 montre que les valeurs D et $t_{1/2}$ diminuent rapidement avec l'augmentation de la température, ce qui est conforme à l'inactivation thermique de l'enzyme PPO, reconnue comme une enzyme non thermostable.

La comparaison avec les valeurs de D et $t_{1/2}$ des PPOs obtenues à partir de quelques sources indique que la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) ($t_{1/2}$ = 35.39 min; 55°C, $t_{1/2}$ = 11.08 min; 60°C, $t_{1/2}$ = 0.56 min; 70°C) est moins stable thermiquement que la PPO du Yali poire (*Pyrus bretschneideri*) ($t_{1/2}$ = 6 min; 70°C) (Zhou et al., 1991), de la pomme ($t_{1/2}$ = 6 min; 70°C) (Yemenicioglu et al., 1997), de l'avocatier (*Persea americana*) ($t_{1/2}$ = 8 min; 70°C) (Kahn, 1997), du Taro ($t_{1/2}$ = 26.9 min; 60°C, $t_{1/2}$ = 14.3 min; 70°C) (Yemenicioglu et al., 1999) et de l'ananas ($t_{1/2}$ = 93.66 min; 55°C, $t_{1/2}$ = 79.67 min; 60°C, $t_{1/2}$ = 63.01 min; 70°C) (Chutintrasria et Noomhorm, 2006). Par contre la PPO du champignon de Paris est plus stable thermiquement par rapport à la PPO du raisin blanc (var. *Victoria*, l'Afrique du sud) ($t_{1/2}$ = 4.43 min; 55°C, $t_{1/2}$ = 1.15 min; 60°C) (Râpeanu et al., 2006).

Le Tableau 7 montre également que les valeurs de la constante de vitesse d'inactivation (k) et D augmentent et diminuent respectivement avec l'augmentation de la température. Ceci indique clairement que la PPO s'inactive rapidement aux températures élevées (Gheibi et al., 2006 ; Gnangui et al., 2009).

La figure 29 représente le logarithme népérien de la constante de vitesse d'inactivation en fonction de l'inverse de la température absolue, permettant la détermination de l'énergie d'activation E_a par la loi d'Arrhenius. Le graphe possède un aspect linéaire ($R^2 = 0.9667$) dans toute la gamme des températures explorée expérimentalement. La pente de la courbe vaut $(-E_a/R)$. L'énergie d'activation de l'oxydation du catéchol par la PPO est estimée à 208.37 kJ/mol. Elle est plus élevée que celle de la PPO du Taro (*Colocasia antiquorum*) 87.78 kJ/mol (Yemenicioglu et al., 1999), de la PPO de l'ananas (Chutintrasri et Noomhorm, 2006) 23.70 kJ/mol ; de la PPO de Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv Longbô) (Gnangu et al., 2009) 67.67 kJ/mol et de la PPO de banane 155 kJ/mol (*Musa cavendishii*) (Ünal et al., 2007), mais inférieure que celles de la PPO du raisin blanc (var. Victoria, l'Afrique du sud) ; 221.5 kJ/mol (Râpeanu et al., 2006), de la PPO du raisin de table (*Crimson Seedless*) ; 295.5 kJ/mol (Forte et al., 2009) et de la PPO de pêche; 502 kJ/mol (Chan et Yang, 1971).

Les grandes valeurs d'énergie d'activation (E_a) reflètent une grande sensibilité de la PPO au changement de la température (Weemaes et al., 1998; Chutintrasri et Noomhorm, 2006).

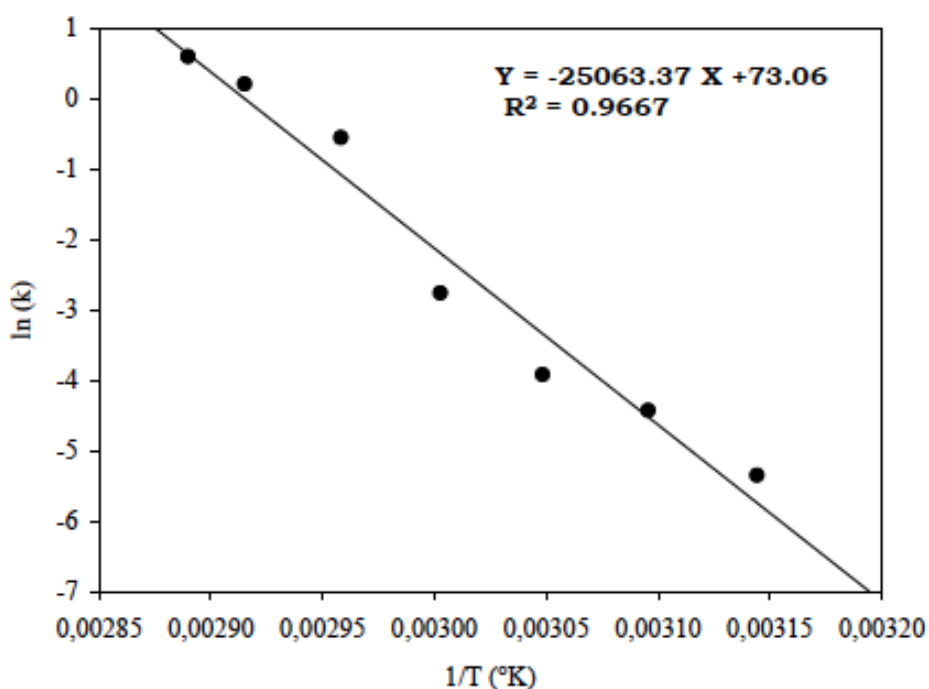


Figure 29: Graphique d'Arrhenius relatif à la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

La relation entre le temps de réduction et la température est présentée dans la Figure 30. La pente de la courbe est représenté par $-1/Z_T$.

La valeur de Z_T pour la PPO du champignon de Paris, 10.1°C, à 45-73°C, est dans la gamme des valeurs trouvées pour d'autres PPOs obtenues à partir de fruits qui sont

comprises entre 8.5 à 10.95°C (Ünal et *al.*, 2007 ; Râpeanu et Bulancea, 2005 ; Ünal et Şener, 2006 ; Râpeanu et *al.*, 2006 ; Strubi et *al.*, 1975; Vámos-Vigyázó, 1981).

En générale, une faible valeur de Z_T indique une grande sensibilité vis-à-vis de la température (Barrett et *al.*, 1999). La PPO du champignon de Paris est moins thermostable, comparativement parlant, aux PPOs obtenues à partir de l'ananas ($Z_T = 104.2$ °C) (Chutintrasri et Noomhorm, 2006), de taro ($Z_T = 25.5$ °C) (Yemenicioğlu et *al.*, 1999), d'haricot de vanille ($Z_T = 21$ °C) (*Vanilla planifolia*) (Waliszewski et *al.*, 2009), de banane (*Musa cavendishii*) ($Z_T = 14.2$ °C) (Ünal, 2007) et de Yam ($Z_T = 29.41$ °C) (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv Longbô) (Gnangui et *al.*, 2009).

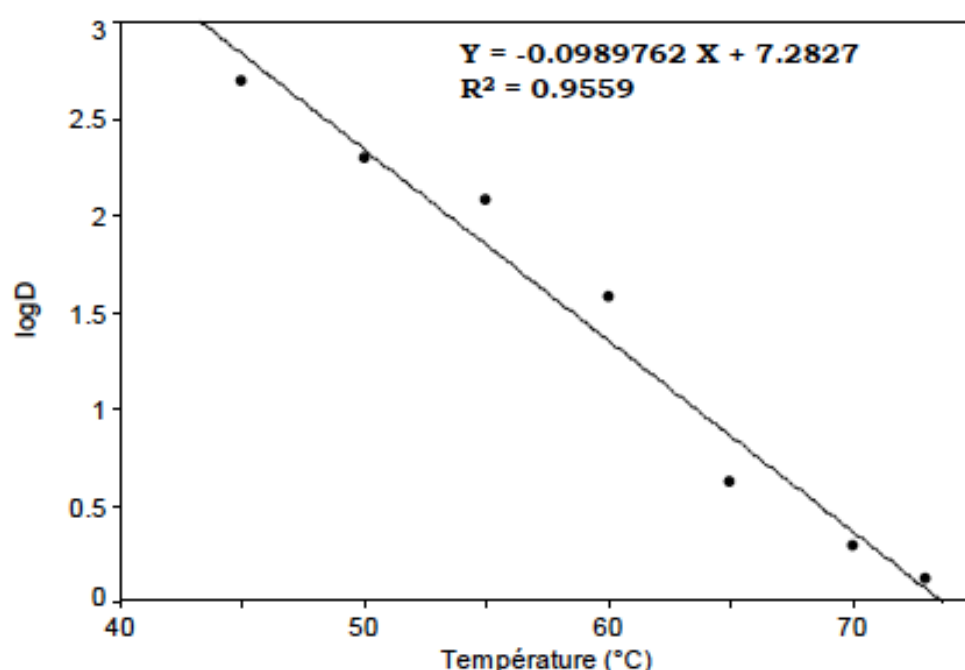


Figure 30: Effet de la température sur la valeur D de l'inactivation de la PPO de champignon (*Agaricus bisporus*).

3.2. Analyse thermodynamique

Le calcul des paramètres thermodynamiques de l'inactivation fournit des informations sur la stabilité thermique de l'enzyme pour chaque étape du procédé de dénaturation induit par la chaleur. Cela pourrait aider à détecter toute stabilisation secondaire ou des effets de déstabilisation qui peuvent passées inaperçu si seul le temps de demi-vie est considéré. Ces paramètres inclus ΔG , l'énergie libre de Gibbs, considérée comme la barrière d'énergie de l'inactivation de l'enzyme, ΔH , le changement d'enthalpie qui mesure le nombre de liaisons détruites durant l'inactivation, et ΔS , le changement d'entropie qui indique le désordre du système enzyme/solvant. Elles ont été calculées dans la gamme de températures de 50 à 73°C à partir des données expérimentales en utilisant les équations (9-11).

Sur le tableau 8, les résultats de ΔH montrent que dans l'intervalle d'erreur de nos mesures, l'enthalpie est indépendante de la température. Il n'y a donc pas de changement dans la capacité thermique de l'enzyme. La valeur moyenne de ΔH trouvée dans cette étude (227 kJ/mol) est plus élevée que celles trouvées pour d'autres PPOs, tels que la PPO du champignon *Lepista nuda* (13 kJ/mol) (Colak et al., 2007) et la PPO d'haricot de vanille (89 kJ/mol) (Waliszewski et al., 2009). En générale, ΔH est considérée comme le nombre des liaisons non covalentes détruites pendant la formation de l'état de transition pour l'inactivation de l'enzyme. Par conséquent, plus le ΔH est élevée, plus grand est le nombre des liaisons non covalentes dans la molécule d'enzyme qui va être plus stable. En fait, la stabilité d'une protéine est le résultat d'un équilibre délicat entre les forces de stabilisation et de déstabilisation qui peuvent être influencés par plusieurs facteurs, par exemple le nombre de liaison hydrogène et les ponts disulfures, le degré de repliement, l'hydrophobicité de la molécule et la teneur des interactions ioniques ou autres (Bruins et al., 2001).

Table 8. Les paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus* J.E Lange Imbach) à différentes températures.

Température (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K)
50	227.31±5.78 ^a	103.07±0.25	384.65±17.13
55	227.27±5.78	102.69±0.37	379.82±16.50
60	227.23±5.78	101.03±0.04	378.97±17.52
65	227.19±5.78	96.72±0.11	386.00±16.76
70	227.15±5.78	96.21±0.18	381.73±16.33
73	227.12±5.78	95.22±0.26	381.22±17.48

Nos résultats suggèrent donc que la PPO du champignon *Agaricus bisporus* est structuralement plus robuste par rapport aux autres enzymes. Cependant, Forsyth et al. (1999) ont soulevé des questions sur l'utilisation convenable des valeurs de ΔH seules comme indicateurs de la stabilité de l'enzyme (Forsyth et al., 1999). Par contre, la valeur de ΔG est directement liée à la stabilité d'une protéine: ΔG est élevée, plus grande est la stabilité de l'enzyme. Quand la température d'incubation augmente de 50 à 73°C, il y a une réduction significative des valeurs de ΔG pour la PPO de champignon de 103 kJ/mol à 95 kJ/mol (Tableau 8), indiquant la déstabilisation de cette protéine suite à l'augmentation de la température. Toutes les valeurs ΔG sont en accord avec la valeur de 100 kJ/mol caractéristique de la réaction de dénaturation de protéine comme trouvé pour d'autres PPOs (Waliszewski et al., 2009 ; Gnanoui et al., 2009).

Puisque ΔG diminue avec l'augmentation de la température tandis que ΔH est globalement constante, on peut s'attendre à une contribution significative des changements d'entropie pour la thermodynamique du système considéré. En fait, il a été déjà démontré

que l'entropie d'activation a un rôle majeur dans l'inactivation thermique des protéines en solutions aqueuses (Bromberg et al., 2008). Comme indiqué dans le Tableau 8, toutes les valeurs ΔS pour l'inactivation thermique de la PPO d'*Agaricus bisporus* sont positives et similaires (380 J/mol.K) dans le domaine de température de 50 à 73°C. Ceci suggère une augmentation du désordre ou de l'aspect aléatoire du système enzyme/solvant lors de la dénaturation. La cause la plus commune de l'inactivation thermique des enzymes est la perte de la conformation native (dépliage de la structure tertiaire active de la protéine en polypeptide désordonné), un processus appelé thermodénaturation, qui résulte de l'augmentation de la mobilité moléculaire aux températures élevées (Klibanov, 1983).

Les valeurs positives de ΔS suggèrent que le dépliement de l'enzyme est l'étape limitante de l'inactivation thermique irréversible de la PPO native. Il est également notable que les valeurs de ΔS reportées pour la thermodénaturation de la PPO dans d'autres espèces sont généralement négatives (Waliszewski et al., 2009 ; Colak et al., 2007 ; Zynek et al., 2010). L'influence possible du procédé d'extraction en termes de dénaturation chimique et la présence d'espèces associées avec la PPO dans le système étudié ici ne peut pas être entièrement négligée bien que l'énergie d'activation obtenue dans ce travail est similaire à ceux obtenus pour la PPO extraite à partir d'*Agaricus bisporus* par Zynek et al. (2010). En outre, notre procédé d'extraction est principalement effectué à basse température, limitant ainsi la possibilité de dénaturation. L'extrait aqueux de la PPO d'*Agaricus bisporus* étudié ici contient un système enzymatique structurellement robuste mais thermosensible, où la dénaturation thermique est principalement sous un contrôle entropique.

4. Etude de l'inhibition de la PPO d'*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque, de l'azide de sodium et du fluorure de sodium sur les activités diphénol et triphénol oxydases de la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) est étudié en utilisant le pyrocatechol et le pyrogallol comme substrats.

Les résultats trouvés montrent que tous les inhibiteurs testés ont provoqués une diminution significative des activités di- et triphénol oxydases de la PPO. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 9 et 10. Les coefficients de régression linéaire (R^2) compris entre 0.99-1.00 indique bien que les modèles choisis et décrits ci-dessous sont parfaitement bien adaptés aux données expérimentales.

Tableau 9: Type d'inhibition, K_i et K_{IS} de la PPO d'*Agaricus bisporus* avec le pyrogallol comme substrat.

Inhibiteur	[I] (mM)	K_i (mM)	K_{IS} (mM)	K_m (mM)	V_{max} (UE/mL)	Type d'inhibition	R^2
Acide benzoïque	0	0.0498		2.54	117.08	Compétitive	0.999
	0.13			5.89	94.22		0.999
	0.25			8.43	81.46		0.998
Fluorure de sodium	0	81.08	161.14±18 .17	3.49	103.35	Mixte-type I	0.999
	71.30			4.53	72.29		0.999
	143.00			5.14	54.12		0.998
Azide de sodium	0	3.22		1.64	122.87	Compétitive	0.999
	3.75			3.23	118.13		0.999
	7.50			3.54	96.06		0.998

Tableau 10: Type d'inhibition, K_i , K_{IS} et IC_{50} de la PPO d'*Agaricus bisporus* avec le pyrocatechol comme substrat.

Inhibiteur	[I] (mM)	K_i (mM)	K_{IS} (mM)	K_m (mM)	V_{max} (UE/mL)	Type d'inhibition	R^2	IC_{50} (mM)
Acide benzoïque	0	0.046		0.4416	24.83	Compétitive	0.999	0.147
	0.05			0.8675	23.46		1.000	
	0.1			1.120	22.09		1.000	
Fluorure de sodium	0	148.97	49.19	0.5187	25.0703	Mixte-type II	1.000	123.94
	40			0.3404	14.1778		0.999	
	100			0.2880	7.79		1.000	
Azide de sodium	0	1.39	3.12	0.4416	24.83	Mixte-type I	0.999	3.20
	1			0.5892	19.89		0.999	
	2.5			0.6567	12.49		0.998	

4.1. Inhibition compétitive de l'activité triphénol oxydase de la PPO du champignon de couche par l'acide benzoïque et l'azide de sodium

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation du pyrogallol par la PPO de champignon de couche suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les cinétiques d'inhibitions de l'acide benzoïque et l'azide de sodium agissant sur l'enzyme ont été déterminées par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk.

Les figures 31 et 32 montrent respectivement, les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide benzoïque et d'azide de sodium. La représentation graphique de $1/V_o$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que la valeur de K_m augmente avec la concentration de l'inhibiteur. Ceci indique que l'acide benzoïque et l'azide de sodium sont considérés comme des inhibiteurs compétitifs de l'activité triphénolase de la PPO du champignon de couche. Ces deux inhibiteurs se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

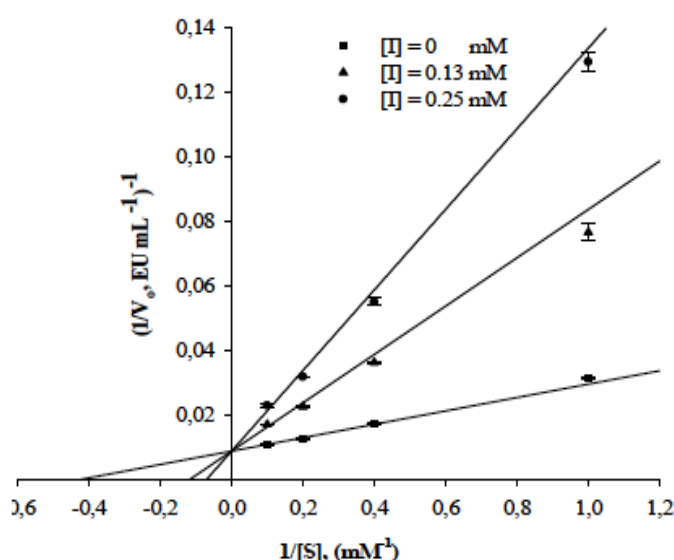


Figure 31: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrogallol par l'acide benzoïque. Concentrations de l'acide benzoïque sont : 0 (■), 0.13 (▲), et 0.25 (●) mM.

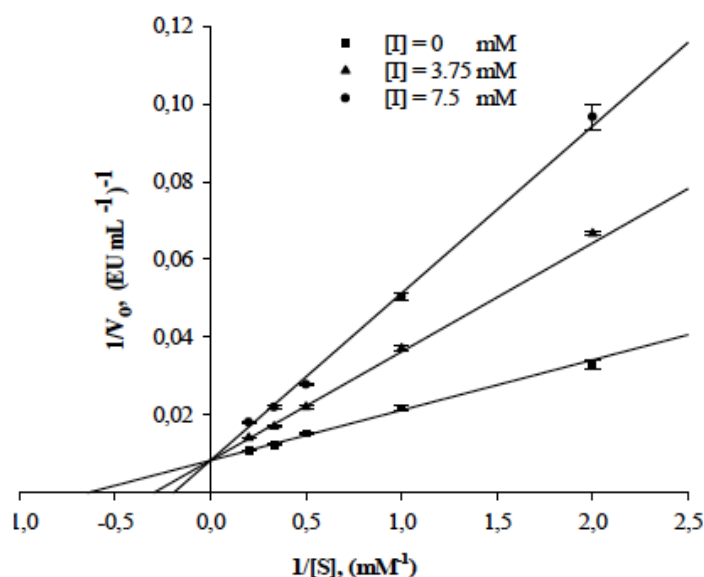


Figure 32: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrogallol par l'azide de sodium. Concentrations de l'acide benzoïque sont : 0 (■), 3.75 (▲), et 7.5 (●) mM.

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme c'est indiqué dans le Tableau 9, les constantes d'inhibition (K_i) pour l'acide benzoïque et l'azide de sodium, utilisant le pyrogallol comme substrat sont respectivement, 0.0498 et 3.22 mM.

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque et par l'azide de sodium observée dans notre étude est en accord avec les résultats trouvés pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (Anosike et Ayaebene, 1982; Ziyen et Pekyardimci, 2004; Doğan et al., 2005; Robert et al., 1997). Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (Pifferi et al., 1974).

Doğan et al. (2005) ont trouvé que l'azide de sodium est un inhibiteur compétitif de la PPO d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) lorsque le pyrogallol est utilisé comme substrat. Ce même auteur (Doğan et al. 2007), observe une inhibition de type non compétitif pour la PPO de basilic (*Ocimum basilicum* L.) par l'azide de sodium, même en présence du pyrogallol comme substrat.

A ce jour, l'azide est toujours considéré comme étant un inhibiteur de la PPO. Ce comportement est lié à son aptitude à former des complexes avec plusieurs enzymes à cuivre. La toxicité des métalloenzymes par l'azide de sodium, en particulier les enzymes à cuivre, est due principalement à sa susceptibilité de s'associer fortement au métal du site actif, ce qui provoque un changement du nombre de coordination et la conformation du site actif (Shi et al., 2002; Gundoğmaz et al., 2003). L'interaction entre l'azide et l'ion cuivre du

site actif, peut entraîner une perte de l'ion cuivre de la protéine et par conséquent l'inactivation de l'enzyme (Burton, 1994).

4.2 Inhibition mixte-type I de l'activité triphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium

Le mécanisme par lequel le fluorure de sodium inhibe l'activité triphénolase de la PPO de champignon de couche a été déterminé. La figure 33 montre les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence de fluorure de sodium. La représentation graphique de $1/V_o$ en fonction de $1/[S]$, et une série de courbes droites de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre coté abscisses négatives et ordonnées positives, au voisinage de -0.15 et +0.5, avec une diminution de la valeur de V_{max} et inversement, une augmentation du K_m . Ces résultats indiquent que le fluorure de sodium est un inhibiteur mixte-type I de l'activité triphénol oxydase de la PPO du champignon de couche.

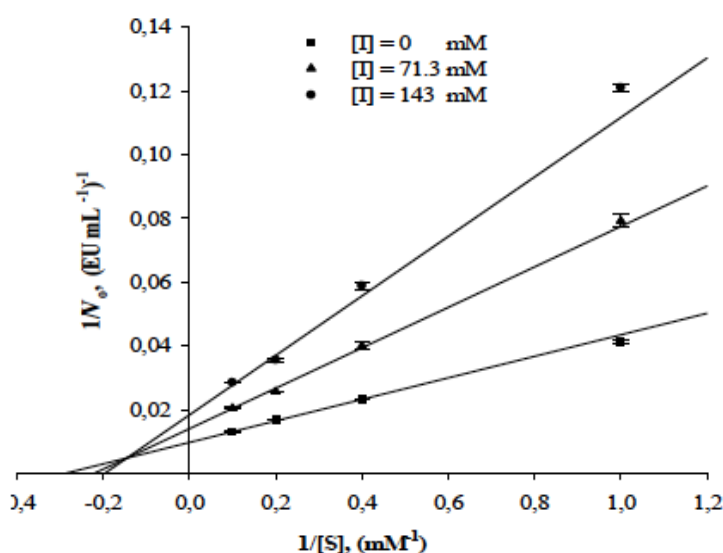


Figure 33: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrogallol par le fluorure de sodium. Concentrations de fluorure de sodium sont : 0 (■), 71.3 (▲), et 143 (●) mM.

Les constantes d'équilibre de la fixation de l'inhibiteur avec l'enzyme libre (K_i), et le complexe enzyme-substrat (K_{is}), sont obtenues respectivement à partir des représentations graphiques des pentes et des points d'intersection verticaux, en fonction de la concentration du fluorure de sodium. Les valeurs de K_i et de K_{is} déterminées sont respectivement, 81.08 et 161.14 mM. Le Tableau 9 montre que pour le fluorure de sodium, le rapport K_{is}/K_i est supérieur à 1. Ceci indique que cet inhibiteur se fixe préférentiellement sur la PPO libre (Bar, 2001). Ce comportement suggère que le fluorure de sodium peut se fixer sur l'enzyme libre

et sur le complexe enzyme-substrat, et que les constantes d'équilibre pour ces deux interactions sont différentes. Dans ce cas, l'inhibition mixte signifie que l'inhibiteur affecte l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, sans pour autant se fixer sur le site actif du substrat (Macrae et Duggleby, 1968).

4.3. Inhibition mixte-type II de l'activité diphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium

Les constantes d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre (E), K_i , et sur le complexe enzyme-substrat (ES), K_{is} , sont obtenues respectivement à partir des graphes secondaires de K_m/V_{max} et $1/V_{max}$ apparentes en fonction de la concentration de l'inhibiteur (I). La cinétique d'inhibition de l'activité diphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium est illustrée dans la Figure 34.

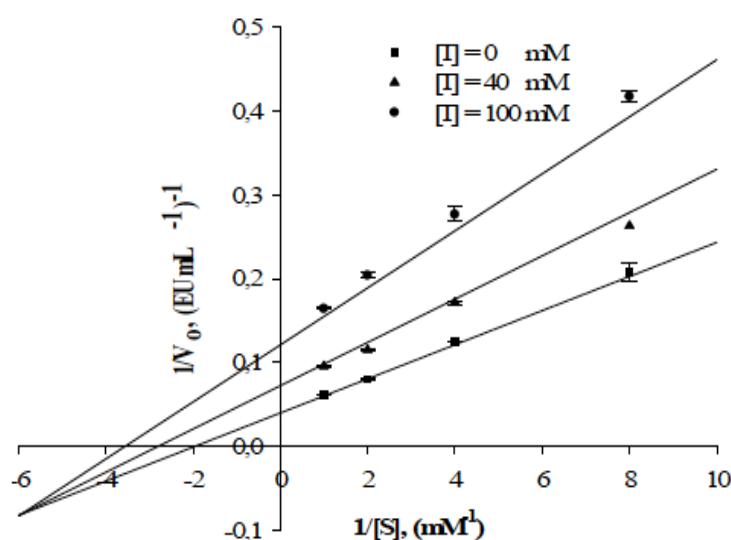


Figure 34: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrocatechol par le fluorure de sodium. Concentrations de fluorure de sodium sont : 0 (■), 40 (▲), et 100 (●) mM.

Dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude, la réaction d'oxydation du pyrocatechol par la PPO suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les valeurs de K_m et V_{max} diminuent simultanément avec l'augmentation de la concentration du fluorure de sodium. Ceci indique que l'inhibition est mixte-type II. L'effet non compétitif étant plus puissant que l'effet compétitif, le fluorure de sodium, inhibe plus facilement l'enzyme libre qu'il inhibe le complexe enzyme-substrat.

Les constantes d'inhibition K_i et K_{is} sont respectivement, 148.97 et 49.19 mM. La valeur K_i grande devant celle de K_{is} , indique que l'affinité de l'inhibiteur est plus élevée pour le complexe enzyme-substrat par rapport à l'enzyme libre (Han et al., 2008). Ces résultats sont

regroupés dans le Tableau 10.

En terme du mécanisme d'inhibition, les résultats suggèrent que le fluorure de sodium se fixe sur l'enzyme libre et aussi sur le complexe enzyme-substrat (Song et *al.*, 2005). A partir de ces résultats, on peut supposer que le site de fixation du substrat de l'enzyme peut être occupé soit par le substrat soit par l'inhibiteur mais on ne peut pas exclure la possibilité d'existence d'un site spécifique sur la PPO pour la fixation de l'inhibiteur (Walker et Wilson, 1975).

4.4. Inhibition compétitive de l'activité diphénol oxydase de la PPO de champignon de couche par l'acide benzoïque

Le comportement cinétique de l'oxydation du pyrocatechol par la PPO du champignon de couche est étudié. Dans les conditions de l'étude, l'oxydation du pyrocatechol par la PPO suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les études cinétiques de l'enzyme en présence de l'acide benzoïque sont représentées par le graphique de Lineweaver-Burk (Figure 35).

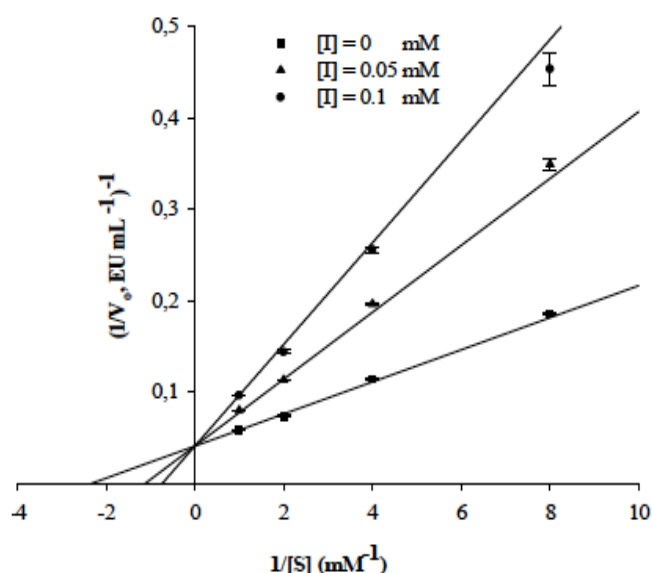


Figure 35: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrocatechol par l'acide benzoïque. Concentrations de l'acide benzoïque sont : 0 (■), 0.05 (▲), et 0.1 (●) mM

Les résultats indiquent que l'acide benzoïque agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la PPO. L'augmentation de la concentration de l'acide benzoïque se traduit par une série de courbes droites de pentes différentes, ayant le même point d'intersection sur l'axe $1/V_0$, à environ 0.05.

La constante d'équilibre de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i , a été obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m), en fonction de la concentration de l'acide benzoïque. La valeur de la constante ainsi obtenue

est de 0.046 mM. Les constantes cinétique et de l'inhibition sont indiquées dans le Tableau 10. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Duckworth et Coleman (1970).

4.5. Inhibition mixte-type I de l'activité diphénol oxydase de la PPO du champignon de couche par l'azide de sodium

Dans les conditions expérimentales utilisées dans l'étude, l'oxydation du pyrocatechol par la PPO du champignon de couche suit une cinétique de Michaelis-Menten. D'après la représentation de Lineweaver-Burk, les droites pour l'enzyme non inhibée et pour les deux différentes concentrations d'azide de sodium se croisent du côté gauche de l'axe $1/V_0$ et au dessus de l'axe $1/[S]$, avec une diminution de V_{max} et inversement une augmentation du K_m , indiquant que l'azide de sodium provoque une inhibition mixte-type I pour l'oxydation du pyrocatechol par la PPO du champignon de couche (Figure 36).

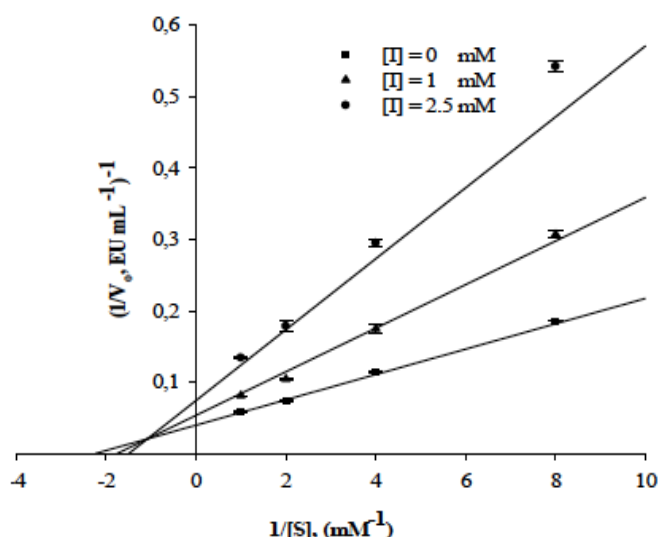


Figure 36: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrocatechol par l'azide de sodium. Concentrations de l'azide de sodium sont : 0 (■), 1 (▲), and 2.5 (●) mM.

L'inhibition mixte-type I, indique que l'azide de sodium affecte l'affinité de l'enzyme pour le pyrocatechol, sans se fixer sur le site actif de l'enzyme. Dans le Tableau 10, on remarque que le rapport K_{IS}/K_I est supérieur à 1 pour l'azide de sodium. Ce qui indique que l'affinité de ce composé pour l'enzyme libre est élevée par rapport à celle pour le complexe enzyme-substrat.

Doğan *et al.* (2007) ont observé une inhibition de type non-compétitive par l'azide de sodium pour la PPO du basilic (*Ocimum basilicum* L.) utilisant le pyrocatechol comme substrat. Arslan et Doğan (2005) ont trouvé que l'azide de sodium est un inhibiteur non-compétitif pour les PPOs obtenues à partir d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) et de basilic (*Ocimum basilicum* L.) lorsque le pyrocatechol était utilisé comme substrat. De plus, Aydemir

et al. (2003) ont trouvé que l'azide de sodium agit en tant qu'inhibiteur compétitif pour la PPO extraite à partir d'artichaut de Jérusalem (*Helianthus tuberosus*) lorsque le pyrocatechol était utilisé comme substrat.

4.6 Bilan

Afin de comparer le pouvoir inhibiteur de ces différents agents, leurs valeurs d' IC_{50} , définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%, ont été déterminées dans les mêmes conditions. Les figures 37, 38 et 39 représentent respectivement le pourcentage d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque, le fluorure de sodium et l'azide de sodium, utilisant le pyrocatechol comme substrat. Les valeurs d' IC_{50} ainsi obtenues sont regroupées dans le Tableau 10.

Sur les trois inhibiteurs testés, l'acide benzoïque est le plus puissant avec une IC_{50} de 0.147 mM. Le second est l'azide de sodium avec une IC_{50} de 3.20 mM, suivie du fluorure de sodium avec une IC_{50} de 123.94 mM.

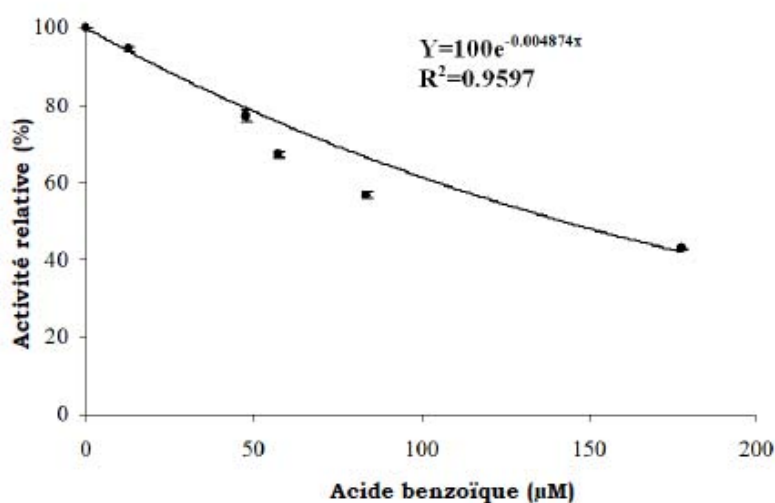


Figure 37: Effet de la concentration de l'acide benzoïque sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de champignon de couche. Les conditions d'essai : 25°C, 2.0 ml de milieu réactionnel contient 0.1 M de tampon K_2HPO_4 - KH_2PO_4 (pH 7.0), 0.4 mM de pyrocatechol, et 10 µL de la PPO de champignon de couche.

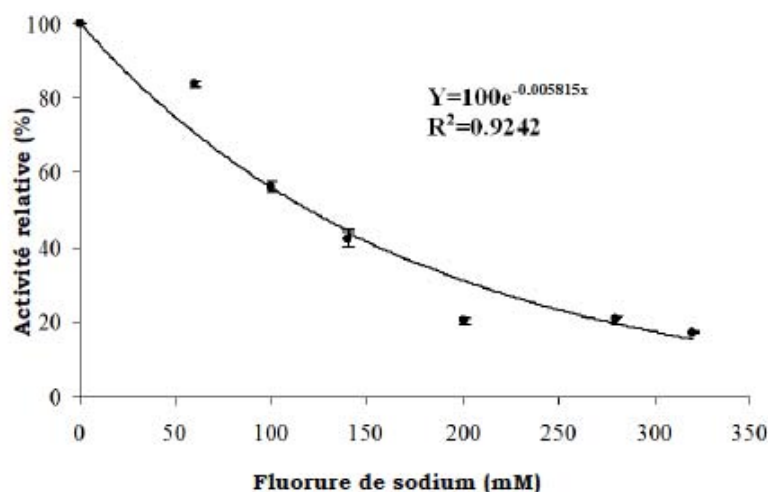


Figure 38: Effet de la concentration du fluorure de sodium sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de champignon de couche. Les conditions d'essai : 25°C, 2.0 ml de milieu réactionnel contient 0.1 M de tampon K_2HPO_4 - KH_2PO_4 (pH 7.0), 0.4 mM de pyrocatechol, et 10 μ L de la PPO de champignon de couche.

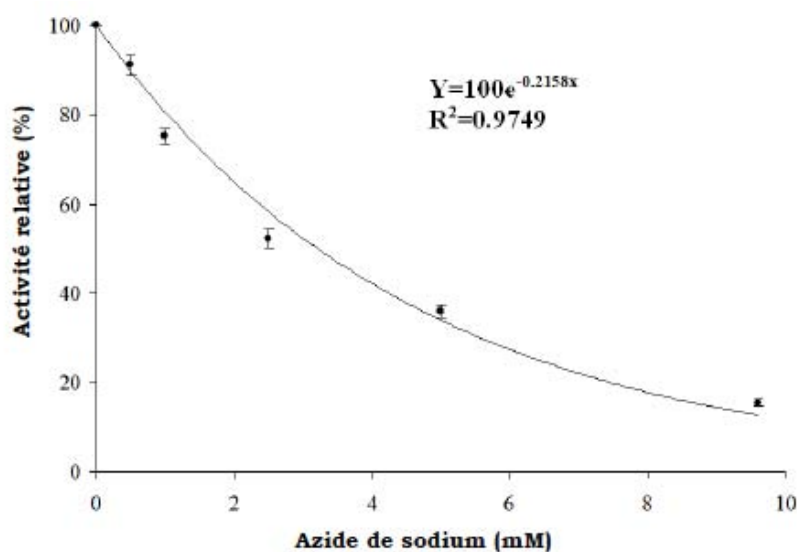


Figure 39: Effet de la concentration de l'azide de sodium sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de champignon de couche. Les conditions d'essai : 25°C, 2.0 ml de milieu réactionnel contient 0.1 M de tampon K_2HPO_4 - KH_2PO_4 (pH 7.0), 0.4 mM de pyrocatechol, et 10 μ L de la PPO de champignon de couche.

Comme indiqué précédemment, le type d'inhibition et la valeur de K_i dépendent de la structure du substrat et de l'inhibiteur (Vámos-Vigyázó, 1981). Le type d'inhibition dépend aussi de l'origine de la PPO étudiée (Robert et *al.*, 1997). Par conséquent, aucune règle générale ne peut être établie pour le type d'inhibition observé.

Les valeurs de K_i et K_{is} indiquées dans les tableaux 9 et 10 suggèrent que l'inhibiteur le plus efficace pour les deux activités, di- et triphénol oxydases de la PPO de champignon de

couche est l'acide benzoïque, à cause de sa valeur K_i qui est la plus faible. Ce résultat est en accord avec les mesures d' IC_{50} . Le fait qu'il soit un analogue structural des substrats de la PPO peut expliquer son pouvoir inhibiteur élevé. Il faut d'ailleurs noter que l'acide benzoïque est couramment utilisé en technologie alimentaire, et peut être utile dans la prévention du brunissement enzymatique des champignons comestibles (Yağar et Sağiroğlu, 2002).

Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

(1 publication internationale)

Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

1. Extraction de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

Une des caractéristiques inhabituelle et intrigante de la PPO, c'est qu'elle se trouve à l'état inactif ou latent dans les tissus naturels (Mayer et Harel, 1979). Dans notre travail, il est apparu que la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.), localisée principalement dans les épiluchures, était presque totalement latente après une simple extraction. L'ajout de SDS au tampon d'extraction a permis de détecter l'augmentation de l'activité de la PPO. Par comparaison avec l'activité maximale obtenue après activation, on peut estimer que seul 8% de l'extrait enzymatique est à l'état activé lors de l'extraction.

Il a été rapporté que la PPO pouvait être activée par différents traitements tel que le choc acide ou basique, l'urée, les acides gras, les protéases et les détergents comme le SDS. Ce dernier agent est particulièrement intéressant parce que peu d'enzyme sont connues pour être activées par le SDS, alors que beaucoup d'enzyme sont inactivées par ce composé (Moore et Flurkey, 1990 ; Pérez-Gilabert et al., 2001). Ces auteurs suggèrent que l'activité mesurée en présence de SDS peut être due à l'activation de la PPO latente par changement de sa conformation causé par la fixation d'une petite quantité de SDS sur le site actif de l'enzyme. Le SDS peut ouvrir le « chapeau » qui protège le site actif de l'enzyme latente permettant ainsi l'accessibilité des substrats au site actif.

L'activité crésolase de l'extrait brut de la PPO de *Terfezia leonis* est égale à 1.063 UI/ml, mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) et à 30°C en utilisant la L-tyrosine à 1 mM. Elle est 100 fois plus élevée que celle trouvée pour la tyrosinase des truffes noires (*Tuber melanosporum*) (Zarivi et al., 2003).

2. Caractérisation de la PPO

2.1 Effet de pH

L'effet des variations du pH sur les activités catécholase et crésolase de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) diffèrent significativement (Figure 40).

Deux pH apparents optimaux ont été observé pour l'activité catécholase à 30°C : un à pH 3.6 et l'autre à pH 7.0, avec une activité plus élevée à pH neutre qu'à pH acide. Au-dessous et au-delà du pH 7.0 l'activité diminue rapidement. A pH 5.6 et 7.6 l'enzyme perd respectivement environ 34.47 et 39.47% de son activité, tandis que à pH 8.0 l'activité diminue seulement par 64.47% et au dessous de pH 5.6, l'enzyme montre moins que 30% d'activité. L'activité semi-maximale observée à pH 3.6 peut être due à la présence d'une

laccase dans l'extrait de truffe qui peut utiliser le pyrocatechol comme substrat (Thurston, 1994). Ce résultat peut aussi être expliqué par un effet causé par la présence de deux formes d'isoenzyme de la PPO.

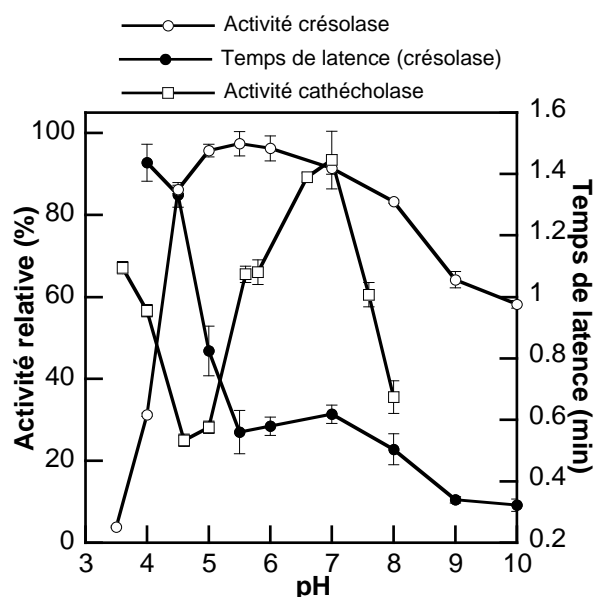


Figure 40. Effet du pH sur les activités de la PPO de truffe *Terfezia leonis* Tul. (○) Activité crésolase à 30°C, (□) Activité catécholase à 30°C, (●) Influence du pH sur la période de latence de l'activité crésolase.

Des résultats similaires ont été déjà trouvés : pH 3.5 et 7.0 pour la PPO de champignon *Portabella* (Zhang et Flurkey, 1997), pH 7.0 pour la PPO de champignon de Paris (Gouzi et al., 2012), pH 7.2 pour la PPO de raisin Izmir (*Vitis vinifera* L.) (Önez et al., 2008), pH 5.5 et 8.0 pour la PPO de framboise (González et al., 1999), pH 5.0 et 7.5 pour la PPO de pomme (Rocha et Morais, 2001), pH 4.4-7.6 et pH 4.7-7.5 pour les PPOs de deux variétés d'avocat (Gómez-López, 2002), pH 4.5 et 6.7 pour la PPO de safran (Saiedian et al., 2007), pH 5.5 et 7.0 pour la PPO de banane Anamur (Ünal, 2007), pH 4.0 et 7.0 pour la PPO d'haricot vert (Guo et al., 2009), utilisant le pyrocatechol comme substrat.

L'activité crésolase de la PPO de truffe possède une large gamme de pH optimal, 4.5-8.0, avec une diminution significative au-delà du pH 8.0 et au-dessous du pH 4.5 (Figure 40). Cet optimum large est une caractéristique remarquable de la PPO de *Terfezia leonis* puisque la plupart des PPOs de différentes sources ont un domaine de pH optimal restreint. Ces résultats sont néanmoins en accord avec ceux trouvés par Pérez-Gilabert et al. (2001) qui ont reporté que l'activité crésolase de la PPO de truffe de désert *Terfezia claveryi*, possède une activité optimale à pH 4.5-5.5, lorsque la L-tyrosine est utilisée comme substrat. De plus,

Zhu et Zhan (2010) ont trouvé que la PPO de *Trapa acornis* a une activité optimale à pH 5 et 8 avec la tyrosine comme substrat.

Il a été reporté que les valeurs du pH optimal des activités crésolase des PPOs du champignon commercial (*Agaricus bisporus*) (McCord and Kilara, 1983) et du raisin d'Izmir (*Vitis vinifera* L.) (Önez et al., 2008) sont respectivement 7 et 7.4 avec la tyrosine comme substrat. En comparaison, il semble que l'activité crésolase de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) est plus active dans le domaine acide par rapport à son activité catécholase. En générale, le pH optimal de la PPO est situé entre 4 et 7, dépend de la source et la méthode d'extraction, de la pureté de l'enzyme, du tampon, du substrat et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Alyward et Haisman, 1969 ; Lourenço et al., 1992). Sur la base de ces résultats, nous avons choisis d'étudier l'activité crésolase à pH 5 et l'activité cathécolase à pH 7.

2.2 Stabilité thermique

Sur la figure 41, les activités crésolase et catécholase résiduelles de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) sont représentées en fonction de la température d'inactivation après 10 minutes de traitement.

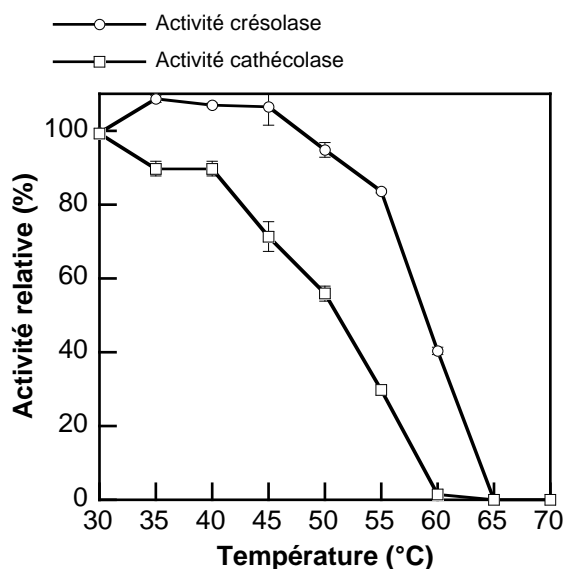


Figure 41. Stabilité thermique des activités de la PPO de truffe *Terfezia leonis*. (○) Activité crésolase à pH 5, (□) Activité cathécolase à pH 7

Les températures optimales des activités crésolase et cathécolase sont respectivement 30 et 45°C. De 30 à 40°C, l'activité cathécolase résiduelle diminue légèrement (10.29%),

mais une inactivation rapide se produit à partir de 40°C jusqu'à 60°C. L'activité crésolase diminue rapidement aux températures supérieures à 55°C et elle est complètement inactivée à 65°C. Dix minutes de traitement à 50 et 55°C réduit les activités catécholase et crésolase dans l'extrait de truffe respectivement par 5.17-16.36% et 44.11-70.22%. L'activité catécholase est presque totalement inactivée après 10 min de traitement thermique à 60°C, tandis que l'activité crésolase maintient approximativement 40.37% de son activité initiale. Il peut être conclu que l'activité crésolase est plus thermorésistante que l'activité catécholase.

En accord avec nos résultats, l'activité catécholase de la PPO extraite à partir de banane Anamur (*Musa cavendishii*) (Ünal, 2007), des racines du Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) (Neves et Da Silva, 2007), du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Doğan et al., 2011), de raisin (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) (Ünal et al., 2007), de la mangue (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) (Wang et al., 2007), et de la fraise (*Fragaria ananassa*, cv. Elsanta) (Dalmadi et al., 2006) ont été trouvées optimales à 30°C et s'inactivent au-delà de cette température, lorsque le pyrocatechol est utilisé comme substrat. En parallèle, McCord et Kilara (1983) et Gouzi et al. (2012) ont trouvé respectivement que l'activité crésolase et catécholase du champignon comestible *Agaricus bisporus* sont optimales à 45 et 35°C.

2.3. Effet de la concentration de l'enzyme

La figure 42 montre une dépendance linéaire entre la concentration de l'enzyme et la vitesse initiale obtenue pour l'activité crésolase. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'activité catécholase. A concentration plus élevée en enzyme, on a observé une diminution de l'activité qui peut être due à l'inhibition de l'enzyme par l'accumulation des produits formés (Ziyan and Pekyardimci, 2003).

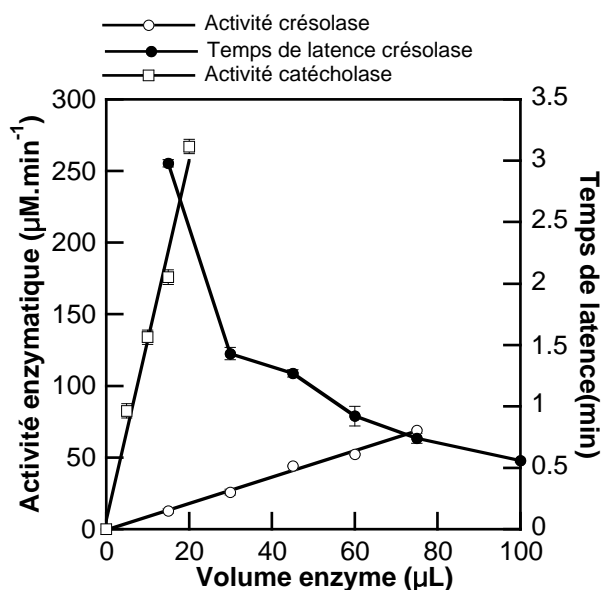


Figure 42. Effet du volume d'enzyme sur les vitesses initiale de la réaction de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.). (○) Activité crésolase, (□) Activité catécholase, (●) Influence du pH sur la période de latence de l'activité crésolase.

La période de latence dépend inversement de la concentration de l'enzyme, ce qui est similaire avec les résultats trouvés pour la PPO d'autres sources (Espín et *al.*, 1997; Sojo et *al.*, 1998; Pérez-Gilabert et *al.*, 2001; Orenes-Piñero et *al.*, 2006).

2.4 Effet de la concentration du substrat

La constante de Michaelis-Menten (K_m), la constante d'inhibition par le substrat (S) et la vitesse maximale de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis*) ont été déterminé pour la L-tyrosine et le pyrocatechol comme substrat à différentes concentrations dans les conditions optimales (pH et température). La courbe de la vitesse d'oxydation de la tyrosine ou du pyrocatechol en fonction de la concentration du substrat est hyperbolique dans la première partie de la courbe, suggérant que la cinétique est Michaelienne (Figures 43, 44). Ce point a été confirmé par la linéarité de la représentation de Lineweaver-Burk. Dans la deuxième partie de la courbe, l'activité enzymatique diminue pour des concentrations de tyrosine et de pyrocatechol supérieures à 1 et 30 mM, respectivement. Les formes de ces graphes sont typiques des enzymes montrant une inhibition par le substrat (Selinheimo et *al.*, 2009; Gouzi et *al.*, 2012). Ce phénomène peut être expliqué par une fixation non productive d'une molécule secondaire de substrat sur le site actif (Trowbridge et *al.*, 1963). Cependant, la cinétique de l'oxydation de la L-tyrosine et le pyrocatechol par la PPO de truffe de désert obéit au modèle cinétique de Haldane. L'inhibition par le substrat a été reporté pour d'autres PPOs utilisant la L-tyrosine et le pyrocatechol comme substrats (Tripathi et *al.*,

1988; Chaya Devi et al., 1989; Paul et Gowda, 2000; Gouzi et Benmansour, 2007; Saiedian et al., 2007; Jaiswal et al., 2010).

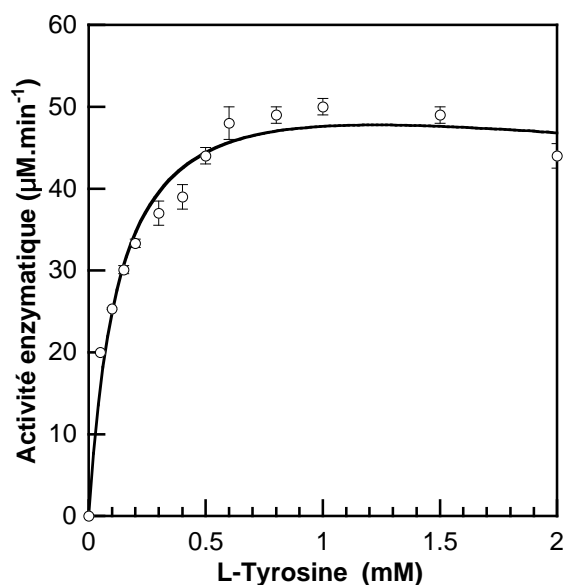


Figure 43. Détermination des valeurs de V_{\max} , K_m et K_s de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) en présence de L-Tyrosine par l'équation de Haldane.

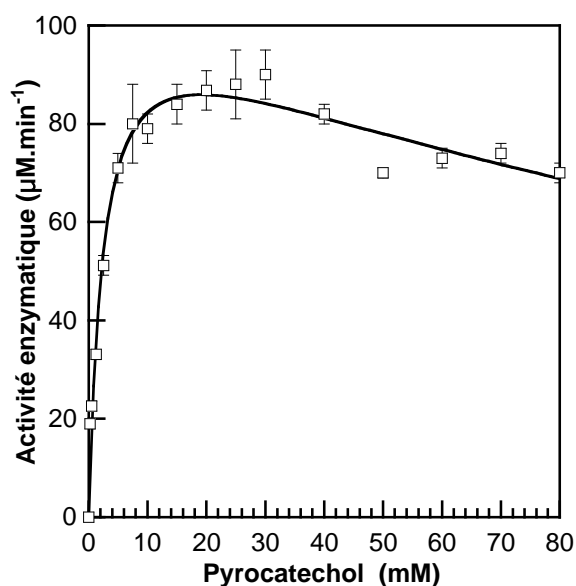


Figure 44. Détermination des valeurs de V_{\max} , K_m et K_s de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) en présence de pyrocatechol par l'équation de Haldane.

Les valeurs de K_m , de K_s et de V_{\max} de l'activité catécholase sont respectivement 2.44 mM, K_s of 148.19 mM et 86.8 µM/min (Tableau 11). La valeur de K_m de l'activité catécholase de la PPO de truffe de désert dans cette étude semble être similaire par rapport à celles

trouvées pour la PPO de champignon *Portabella* (2.1 mM) (Zhang & Flurkey, 1997), de champignon *Trichoderma reesei* (2.5 mM) (Selinheimo et al., 2009), et de raisin Izmir (3.65 mM) (Önez et al., 2008) utilisant le même substrat. Cependant, elle est inférieure à 5.2 mM pour la cerise (Anil Kumar et al., 2008), 6.3 mM pour la mangue (Wang et al., 2007), 10.5 de la graine de feverole (Paul et Gowda, 2000), 10.7 mM de l'artichaut (Doğan et al., 2005), 14.3 mM pour le romarin (Aydemir, 2010), 20 mM pour la prune (Siddiq et al., 1992), 34 mM pour la pomme (Oktay et al., 1995) et 52.6 mM pour le raisin Victoria (Râpeanu et al., 2006).

Les valeurs de K_m , K_s et V_{max} apparentes de l'activité crésolase de la PPO de *Terfezia leonis* sont respectivement 0.1368 mM, 10.3 mM and 50.41 μ M for L-tyrosine. La valeur de K_m trouvé pour la L-tyrosine (0.1368 mM) dans le cas de la PPO de *Terfezia leonis* est plus faible par rapport à celles trouvées pour les PPOs des autres champignons : 0.2, 0.29, 0.42, 1.98, 2 et 2.7 mM dans le cas du champignon comestible (*Agaricus bisporus*) (Selinheimo et al., 2009), de *Tuber melanosporum* (Zarivi et al., 2003), *Tuber magnatum* (Miranda et al., 1996), betterave à sucre (*Beta vulgaris*) (Gandía-Herrero et al., 2005), avocat (Kahn and Pomerantz, 1980), de *Tuber brumale* (Miranda et al., 1992), respectivement. D'autre part, elle est relativement similaire par rapport à celle de *Tuber excavatum* (0.11 mM) (Miranda et al., 1996).

Tableau 11 : Comparaison entre l'efficacité catalytique de l'activité catécholase et crésolase de la PPO de *Terfezia leonis*.

Substrat	V_{max} (μ M/min)	K_m (mM)	K_s (mM)	V_{max}/K_m (μ M/min.mM)
Pyrocatechol	108.37	2.44	148.19	44.41
L-Tyrosine	59.07	0.1368	10.3	431.79

Le critère du choix du meilleur substrat est le rapport V_{max}/K_m élevé (Neves et da Silva, 2007). A partir de la valeur apparente V_{max}/K_m , la L-tyrosine est le meilleur substrat pour la PPO de *Terfezia leonis* avec une valeur de 431.79 μ M/min/mM et 44.41 μ M/min/mM pour le pyrocatechol. Il semblerait que la présence d'un groupement amine permette au substrat de se fixer plus fortement à l'enzyme (Muller et al., 1996).

2.4 Spécificité de substrat

Dans la littérature il existe plusieurs composés phénoliques utilisés comme substrat de la PPO (Dogan et Dogan, 2004). Dans notre étude nous avons sélectionné les substrats les plus fréquemment utilisés : la L-tyrosine, le phénol, le pyrocatechol, le 4-méthylcatechol, le resorcinol, l'hydroquinone, le phloroglucinol, le pyrogallol et l'acide gallique. Les résultats de la spécificité du substrat sont regroupés dans le Tableau 12.

La PPO de *Terfezia leonis* est capable de catalyser les monohydroxy-, dihydroxy-, et les trihydroxyphénols comme substrats avec des degrés variables d'utilisation. On constate que le nombre des groupements hydroxyle ainsi que leur position au niveau du cycle benzène du substrat affectent l'activité de la PPO (Ziyan et Pekyardimci, 2003). L'activité enzymatique la plus élevée a été détectée en présence du catéchol (100%) suivi du pyrogallol (82.65 %), de la L-tyrosine (1.44%) et du phénol (0.077%). Une activité enzymatique plus faible a été mesurée en présence du phloroglucinol (0.042%).

Tableau 12: Spécificité de substrat de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis*).

Substrat	Concentration (mM)	Longueur d'onde (nm)	Activité relative au pyrocatechol (%)
<i>Monophénols</i>			
L-tyrosine	1	475	1.440
Phénol	0.5	395	0.077
<i>Diphénols</i>			
Catéchol	10	410	100
<i>Triphénols</i>			
Phloroglucinol	10	340	0.042
Pyrogallol	20	420	82.65

Ces résultats suggèrent que la PPO de *Terfezia leonis* possède les activités monophénolase, diphénolase et triphénolase ; et par conséquent elle sera classée comme une monophénol monooxygénase, ou par son nom classique la tyrosinase (Wichers et al., 1984 ; Zhang et al., 1999).

Les PPOs de quelques basidiomycètes, par exemple d'*Amanita muscaria* (Muller et al., 1996), du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et Benmansour, 2007; Zhang et Flurkey, 1997) peuvent catalyser l'hydroxylation des monophénols et l'oxydation de o-diphénols. Les résultats de la littérature indiquent que les PPOs de la plupart des végétaux sont spécifiques pour les substrats ortho-diphénoliques (Ziyan et Pekyardimci., 2004). La

PPO du champignon de Paris est connue pour montrer aussi une large spécificité de substrat (Sugumaran et al., 1987).

2.5 Effet de la concentration de SDS

L'effet de la concentration du SDS sur les activités crésolase et catécholase de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert à été étudié.

D'après la Figure 45, on remarque qu'en absence de SDS, les activités crésolase et catécholase sont négligeables et que l'augmentation de la concentration de ce détergent anionique dans le milieu réactionnel cause une augmentation significative de ces activités d'une manière sigmoïdale. Ce comportement a également été observé par plusieurs chercheurs (Espin et Wichers, 1999; Pérez-Gilabert et al., 2001; Gandia-Herrero et al., 2005; Wettenberg et Triplett, 1985).

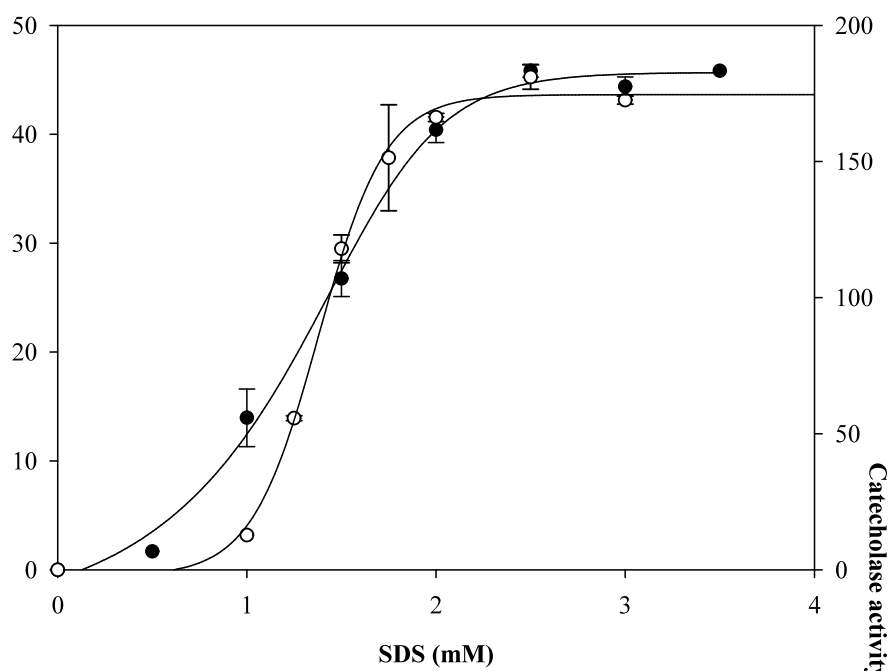


Figure 45. Effet de l'addition du SDS sur (●) l'activité crésolase et (○) l'activité catécholase pour la PPO de *Terfezia leonis* Tul. PPO.

Nos résultats montrent que l'activité crésolase est plus sensible à la variation de la concentration du SDS dans le milieu par rapport à l'activité catécholase. Pour une concentration de SDS à 1 mM, les activités catécholase et crésolase augmentent à 5 et 15%, par rapport à leurs activités mesurées en absence de détergent. Pour des

concentrations supérieures à 2 et 2.5 mM, les activités crésolase et catécholase de la PPO atteignent une valeur maximale et constante.

Plusieurs chercheurs ont observé que le SDS agit comme activateur de la PPO obtenue à partir de différentes sources par exemple : le haricot (Moore et Flurkey, 1990), le betterave (Escribano et *al.*, 1997), la poire (Laveda et *al.*, 2000) et le champignon de Paris (Whisher et Espin, 2001). Le mécanisme par lequel le SDS active la tyrosinase reste obscur. Plusieurs mécanismes ont été proposés qui suggèrent que le changement de conformation de l'enzyme suite au déploiement partielle de la structure quaternaire de l'enzyme est à l'origine de l'activation de la tyrosinase par le SDS (Gandia-Herrero et *al.*, 2005 ; Sugumaran et Nellaippan, 1991 ; Moore et Flurkey, 1990 ; Cong et *al.*, 2009; Karbassi et *al.*, 2003; Espin et *al.*, 2002; Kanade et *al.*, 2006).

3. Etude de l'inactivation thermique de la PPO de truffe de desert (*Terfezia leonis* Tul.)

3.1. Etude cinétique

En se basant sur les résultats de la stabilité thermique, des études cinétiques détaillées de l'inactivation isothermique des activités crésolase et catécholase de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) ont été effectuées à pression atmosphérique dans la gamme de température comprise entre 45 et 65°C à différent temps de traitement et leurs propriétés thermodynamiques ont été déterminées. Les courbes semi logarithmiques des activités crésolase et catécholase résiduelles en fonction du temps de traitement thermique sont linéaires dans toutes les températures étudiées (Figure 46), ce qui est conforme avec l'inactivation par un processus du premier ordre. L'extrapolation des courbes sur un point commun indique qu'il s'agit d'une inactivation d'une seule isoenzyme dans chaque cas. Ce résultats sont en accord avec ceux obtenu pour d'autres PPOs de raisin de table (Fortea et *al.*, 2009), des racines de Yacon (Neves et da Silva, 2007), de poire (Halim et Montgomery, 1978), de la mangue (Park et *al.*, 1980), d'haricot de vanille (Waliszewski et *al.*, 2009), de champignon comestible (McCord et Kilara, 1983; Zynek et *al.*, 2010; Gouzi et *al.*, 2012) et d'ananas (Chutintrasri et Noomhorm, 2006), mais différent de ceux obtenus pour la pomme de terre et de carotte (Anthon et Barrett, 2002).

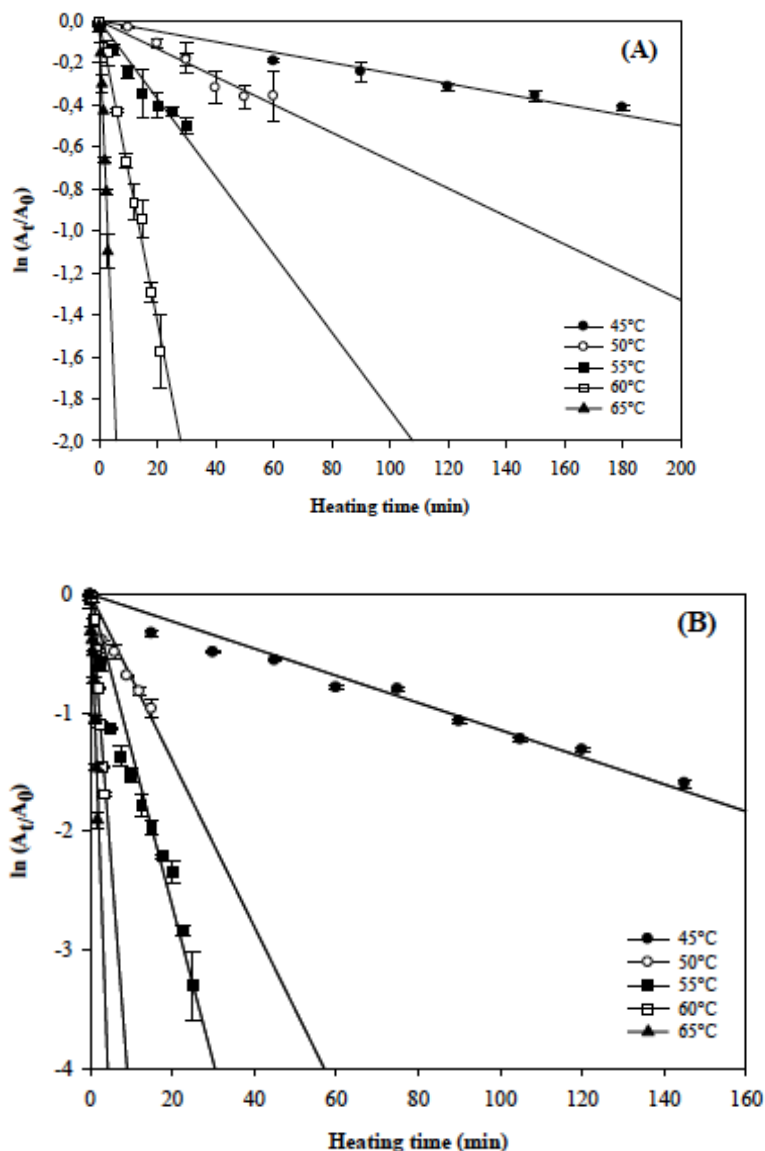


Figure 46: Effet de la température et du temps de traitement thermique sur l'extrait brut de la PPO de *T. leonis*. L'activité enzymatique résiduelle est mesurée en présence de (A) L-tyrosine et (B) pyrocatechol

L'ampleur de dénaturation de la PPO augmente avec la température et le temps de traitement (Patnaik, 2002). La diminution du pourcentage de l'activité résiduelle à des températures élevées est très probablement due dépliement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire. L'activité résiduelle faible de la PPO de truffe de désert est de 39.78% pour l'activité crésolase et 9.60% pour l'activité catécholase, à 55°C après 20 minutes de traitement thermique. De plus, les activités crésolase et catécholase résiduelles sont respectivement seulement 21.61 et 5.16% à 65°C après 2 minutes de chauffage, tandis que l'activité de la PPO garde 8.04% de son activité crésolase initiale après 3 minutes d'incubation à 65°C, ainsi son activité catécholase est complètement

inactivée. Par rapport à d'autres études la PPO d'ananas traitée à 55, 60 et 65°C est relativement thermostable et retient jusqu'à 59.6% de l'activité catécholase après 20 minutes de chauffage (Chutintrasri et Noomhorm, 2006). L'activité de la PPO de Yam comestible diminue au-dessous de 50% après un traitement thermique à 55°C de 20 minutes (Gnangui et al., 2009).

Les constantes de vitesse d'inactivation thermique (k) des activités catécholase et crésolase de *Terfezia leonis* ont été déterminées par l'analyse de régression linéaire de la pente de la courbe linéaire du log% de l'activité résiduelle en fonction du temps d'incubation (min). Comme indiqué dans le Tableau 13, l'activité crésolase est inactivée progressivement à des températures supérieures à 40°C avec des valeurs de k de $2.49 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ et une vitesse d'inactivation rapide se produit ensuite pour atteindre $337.55 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ at 65°C. Une constante de vitesse élevée signifie que l'enzyme est moins thermostable (Marangoni, 2003). A partir du Tableau 13, il est clair que l'activité catécholase est moins thermostable par rapport à l'activité crésolase, qui commence à se dénaturer rapidement a des températures dépassant 40°C, après quoi, la vitesse d'inactivation atteint $938.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ at 65°C.

L'augmentation de la température de 45 à 65°C résulte en une diminution des valeurs de $t_{1/2}$ et de D (Tableau 13). Les valeurs de D et $t_{1/2}$ de l'activité catécholase ($t_{1/2} = 0.74 \text{ min}$, $D = 2.45 \text{ min}$; 65°C) montrent qu'elle est moins thermostable par rapport à la plupart des PPOs de la littérature. Dans le cas de l'activité crésolase de la PPO de truffe les valeurs de D et $t_{1/2}$ obtenues à 55 et 60°C sont respectivement 124.39-32.32 min et 37.45-9.73 min, et sont donc plus élevées que celles de l'activité crésolase de la PPO du champignon comestible (*Agaricus bisporus*) PPO ($t_{1/2} = 12.91 \text{ min}$, $D = 42.90 \text{ min}$; 55°C; $t_{1/2} = 5.16 \text{ min}$, $D = 17.13 \text{ min}$; 60°C) (McCord & Kilara, 1983). Par conséquent, la PPO de truffe de désert est plus thermostable par rapport à l'activité crésolase de la PPO du champignon.

Les logarithmes naturels des valeurs de k pour chaque température-temps de traitement représenté en fonction de l'inverse des températures de chauffage sont indiqués dans la figure 47. Les valeurs E_a calculées à partir de la pente des courbe linéaires des activités crésolase et catécholase de la PPO de truffe de désert sont respectivement 217.41 et 190.73 kJ/mol. Ce résultat montre que la catécholase a une grande sensibilité au changement de la température comparée avec l'activité crésolase (Onsa et al., 2011).

A partir de 45 à 65°C, E_a pour l'inactivation thermique de l'activité catécholase de la PPO de truffe de désert est élevée par rapport à celles trouvées pour les les PPOs de plantain (18 kJ/mol; Ngalani et al., 1993), d'ananas (23.70 kJ/mol; Chutintrasri and Noomhorm, 2006), le marula (37.9 kJ/mol; Mdluli, 2005), le raisin Izmir (*Vitis vinifera* L.) (51.83 kJ/mol; Önez et al., 2008); le yam comestible (67.67 kJ/mol ; Gnangui et al., 2009), l'haricot de

vanille (92.1 kJ/mol; Waliszewski et *al.*, 2009), les racines de yacon (93.69 kJ/mol; Neves and da Silva, 2007) et de banane Anamur (155 kJ/mol; Ünal, 2007). Cependant, la valeur est faible par rapport à celles reportées pour les PPOs obtenues à partir de champignon comestible (*Agaricus bisporus*) (230 kJ/mol, Gouzi et *al.*, 2012), de raisin Victoria (225 kJ/mol; Râpeanu et *al.*, 2006), de raisin Emir (251 kJ/mol; Ünal and Şener, 2006), de raisin de table (295.5 kJ/mol; Fortea et *al.*, 2009), d'avocat (*Persea americana* Mill.) (363.54 kJ/mol; Weemaes et *al.*, 1998) et de la pêche (502 kJ/mol; Dimick et *al.*, 1951). Des valeurs comparables, 208.5 et 219, kJ/mol, sont observées pour l'activité catécholase des PPOs extraites respectivement à partir de raisins Sultaniye (Ünal et *al.*, 2007) et Dechaunac (Lee et *al.*, 1983).

Tableau 15. Les résultats de la cinétique d'inactivation thermique des activité crésolase et catécholase de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.).

Température (°C)	Activité crésolase				Activité catecholase			
	<i>D</i> (min)	<i>k</i> (min ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min)	R ²	<i>D</i> (min)	<i>k</i> (min ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min)	R ²
45	923.88±6.05	0.0024923500	278.11	0.8685	200.24	0.01146	60.27823	0.9662
50	346.63	0.0066488000	104.35	0.9454	32.8678	0.07010	9.8942	0.9148
55	124.396	0.0185360000	37.45	0.9073	17.5142	0.13151	5.272301	0.9323
60	32.327	0.0713550000	9.73	0.9876	5.1813	0.4444	1.559744	0.9419
65	6.822	0.3375500000	2.05	0.9813	2.4541	0.9382	0.7387	0.9336
	<i>Ea</i> = 217.418 kJ/mol (R ² = 0.9851)		<i>Z_T</i> = 9.45°C (R ² = 0.9891)		<i>Ea</i> = 190.737 kJ/mol (R ² = 0.9755)		<i>Z_T</i> = 10.81°C (R ² = 0.9715)	

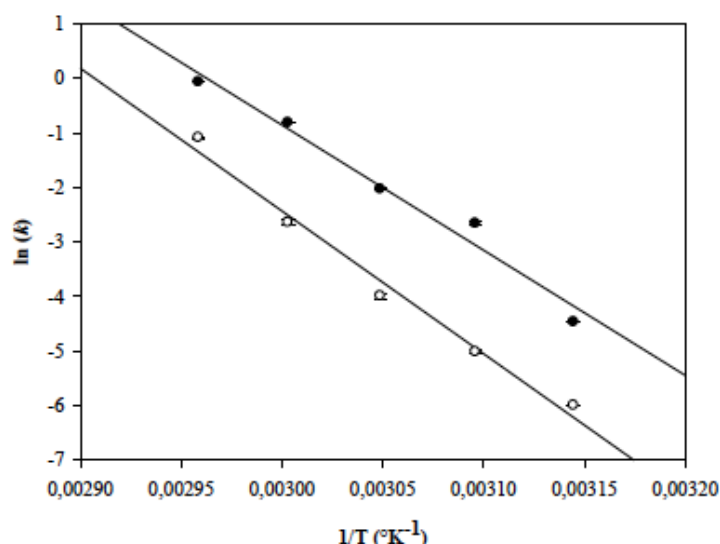


Figure 47: Graphique d'Arrhenius relatif à la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de la truffe du désert (○) Activité crêsolase, (●) Activité catécholase

Ea pour l'activité crêsolase est plus élevée que celle trouvée par McCord & Kilara (1983) pour la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (173.05 kJ/mol), mais étroitement similaire par rapport à celle trouvé pour la PPO de la même source (193.2 kJ/mol; Zynek et al., 2010).

La figure 48 représente la relation entre le temps de réduction décimale et la température, où la pente de la courbe représente $-1/Z_T$. La valeur Z_T estimée pour les activités crêsolase et catécholase de l'extrait brut de la PPO de truffe de désert sont respectivement 9.45°C et 10.81°C, en accord avec la majorité des données de la littérature.

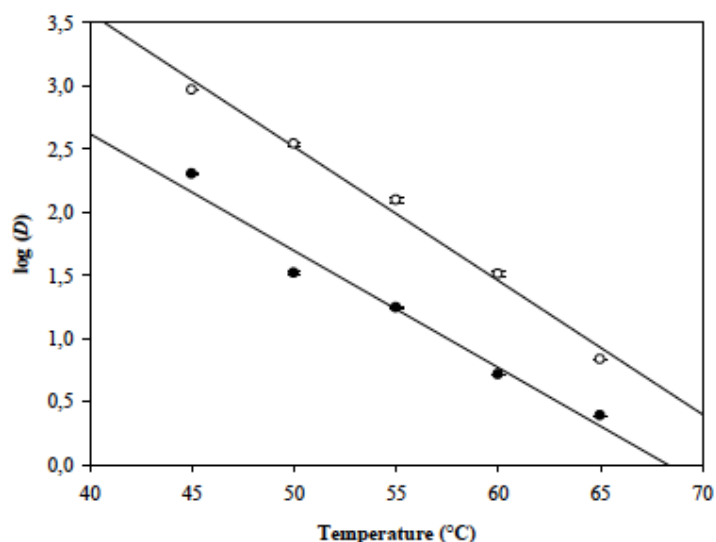


Figure 48: Variation du temps de réduction décimal avec la température pour la PPO de la truffe du désert (○) Activité crêsolase, (●) Activité catécholas

Par exemple, Vámos-Vigyázó and Haard (1981) ont signalé que les valeurs de Z_T de la PPO de plusieurs fruits sont comprises entre 8.5 et 10.1°C. Quelques chercheurs ont trouvé des valeurs élevées de Z_T pour l'inactivation de la PPO isolée à partir de différents aliments. Ainsi, Ünal (2007), Waliszewski et al. (2009), Gnangui et al. (2009) et Chutintrasri et Noomhorm (2006) ont trouvés respectivement les valeurs Z_T de 14.2, 21, 29.41 et 104.2°C pour la PPO de banane, d'haricot de vanille, de yam comestible et d'ananas.

3.2. Analyse thermodynamique

Dans toutes les températures testées, la valeur moyenne de ΔG pour les activités crésolase et catécholase de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis*) est presque similaire à une valeur de 101.86 et 97.13 kJ/mol, respectivement (Table 16). Toutes les valeurs de ΔG dans le Tableau 16 sont en accord avec la valeur constante relative de 100 kJ/mol caractéristique de la réaction de dénaturation d'une protéine (Busto et al., 1999; Yun et al., 2007). La valeur ΔG est directement liée à la stabilité de la protéine: une ΔG élevée indique une stabilité élevée de l'enzyme (Longo & Combes, 1999). Cependant, il peut être conclu que l'activité crésolase de la PPO de truffe est plus thermostable par rapport à l'activité catécholase.

Les changements d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS) des activités crésolase et catécholase de la PPO de truffe ont été calculées et les résultats sont présentés dans le Tableau 16. Les valeurs moyennes de ΔH de l'inactivation thermique de la PPO de truffe sont 214.69 kJ/mol pour la crésolase et 188.01 kJ/mol pour la catécholase. Ces résultats suggèrent que la PPO de *Terfezia leonis* a une activité monophénolase plus thermostable par rapport à l'activité diphénolase, apparemment en raison de la valeur élevée de ΔH pour l'inactivation (Gnangui et al., 2009). La valeur de ΔH value trouvée dans cette étude est beaucoup plus élevée par rapport à celles reportées par Colak et al. (2007) pour la PPO des champignons comestibles, *Lepista nuda* (13 kJ/mol), *Hypholoma fasciculare* (36 kJ/mol) et *Armillaria mellea* (64 kJ/mol), par Duangmal et Owusu Apenten (1999) pour la PPO de pomme de terre (98.02 kJ/mol), par Waliszewski et al. (2009) pour la PPO d'haricot de vanille (89.24 kJ/mol) et par Mdluli (2005) pour la PPO de marula (35.79 kJ/mol). La valeur ΔS trouvée dans cette étude pour l'activité catécholase est élevée par rapport à celles trouvées pour les isoenzymes de la PPO du sagoutier (*Metroxylon sagu*) (137.71-222.87 J/mol.K ; Onsa et al., 2011), mais inférieure par rapport à celle de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (382.06 J/mol.K; Gouzi et al., 2012).

Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

Tableau 16. Les paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique des activité créolase et catécholase de la PPO de truffe de desert (*Terfezia leonis* Tul.) à différentes températures.

Température (°C)	Activité créolase			Activité catécholase		
	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K)
45	214.774±1.527	104.725±0.017	346.068±4.748	188.093±1.105	100.690±0.031	274.85±3.37
50	214.733±1.527	103.780±0.115	343.508±4.372	188.051±1.105	97.454±0.089	280.48±3.14
55	214.691±1.527	102.633±0.144	341.642±4.216	188.010±1.105	97.288±0.059	276.59±3.55
60	214.650±1.527	100.508±0.166	342.768±5.085	187.968±1.105	95.441±0.007	277.85±3.34
65	214.608±1.527	97.689±0.041	345.913±4.395	187.926±1.105	94.816±0.00063	275.47±3.27

^aMoyenne (n = 3)±Ecart type.

Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

Les grandes valeurs de ΔH et ΔS observées pour l'activité crésolase peuvent être expliquées par l'existence possible d'un complexe relativement hautement structuré entre l'enzyme et d'autres molécules de l'extrait comme reporté par Laidler et Peterman (1979). Un tel complexe est susceptible de protéger l'enzyme contre l'inactivation thermique. Des observations similaires ont été rapportées pour la PPO de taro (Duangmal *et al.* 1999).

4. Etude de l'inhibition de la PPO de truffe de désert

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque, de l'azide de sodium et du fluorure de sodium sur les activités diphénol et triphénol oxydases de la PPO de la truffe du désert *Terfezia leonis* est étudié en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Les résultats trouvés montrent que tous les inhibiteurs testés ont provoqués une diminution significative des activités di- et triphénol oxydases de la PPO. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 9 et 10. Les coefficients de régression linéaire (R^2) compris entre 0.91-0.99 indique bien que les modèles choisis et décrits ci-dessous sont plutôt bien adaptés aux données expérimentales

4.1. Inhibition non-compétitive de la PPO des truffes par l'azide de sodium

Le mécanisme par lequel l'azide de sodium inhibe l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis* a été déterminé. La figure 49 montre les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence de l'azide de sodium. La représentation graphique de $1/V_o$ en fonction de $1/[S]$, et une série de courbes parallèles, avec une diminution de la valeur de V_{max} et pareillement, une diminution du K_m . Ces résultats indiquent que l'azide de sodium est un inhibiteur non compétitif de l'activité diphénol oxydase de la PPO des truffes lorsque le catéchol est utilisé comme substrat.

La constante d'équilibre de la fixation de l'inhibiteur avec le complexe enzyme-substrat (K_{IS}), est obtenue à partir des représentations graphiques des points d'intersection verticaux, en fonction de la concentration de l'azide de sodium. La valeur de K_{IS} ainsi déterminée est de 3.3792 mM (Tableau 19).

Erat *et al.* (2010) ont observé pour l'azide de sodium est un inhibiteur de type compétitif de la PPO de blé, alors que Aydemir et Akkanli (2006) et Tülin (2004) ont trouvé que l'inhibition est de type non compétitif pour la PPO de céleri (*Apium graveolens* L.) et d'artichaut (*Cynara scolymus* L.), en utilisant le catéchol comme substrat.

Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

Tableau 17: Type d'inhibition, K_I , K_{IS} et IC_{50} de la PPO de *Terfezia leonis* avec le pyrocatechol comme substrat.

Inhibiteur	[I] (mM)	K_I (mM)	K_{IS} (mM)	K_{IS}/K_I	K_m (mM)	V_{max} (Abs/min)	Type d'inhibition	R^2
Fluorure de sodium	0	1.47	1.86	1.26	2.58	0.2422	Mixte-type I	0.957
	75				2.82	0.1576		
	100				2.94	0.1168		
Acide benzoïque	0	3.54			3.207	0.2177	Compétitive	0.954
	10				12.25			
	15				16.78			
Azide de sodium	0		3.3792		2.7359	0.2453	Incompétitive	0.949
	2				1.7187	0.1541		
	5				1.1033	0.09894		

Chapitre 4. Extraction et caractérisation de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.)

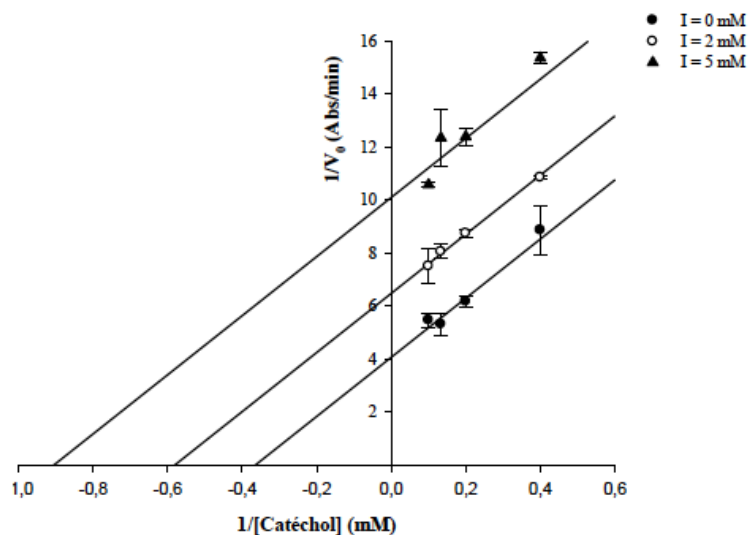


Figure 49: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de la truffe du désert sur le pyrocatechol par l'azide de sodium. Concentrations de l'azide de sodium sont : 0 (●), 2 (○) et 5 mM (▲).

4.2. Inhibition compétitive de la PPO des truffes par l'acide benzoïque

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation du catéchol par la PPO de truffes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de l'acide benzoïque agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk.

La figure 50 montre le graphique de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide benzoïque. La représentation graphique de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Ceci indique que l'acide benzoïque est considéré comme inhibiteur compétitif de l'activité catécholase de la PPO de truffe. Ceci est en accord avec le fait que l'acide benzoïque, tout comme l'acide ascorbique, se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

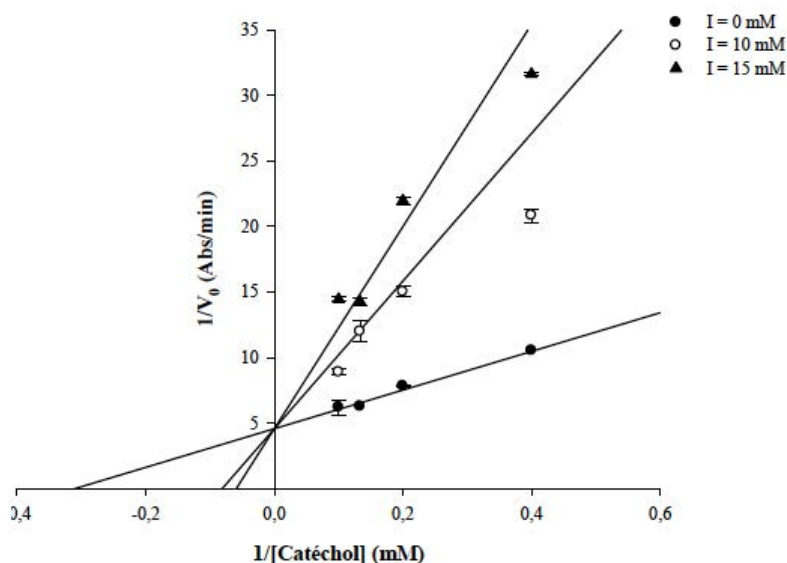


Figure 50: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de la truffe du désert sur le pyrocatechol par l'acide benzoïque. Concentrations de l'acide benzoïque sont : 0 (●), 10 (○) et 15 mM (▲).

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme c'est indiqué dans le Tableau 17, la constante d'inhibition (K_i) pour l'acide benzoïque, en utilisant le catéchol comme substrat, est 3.54 mM.

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque observée dans notre étude, est en accord avec les résultats trouvés pour la PPO de champignons par Harry et *al.*, (1970) et pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (Anosike et Ayaebene, 1982; Ziyen et Pekyardimce, 2004 ; Dogan et *al.*, 2005; Robert et *al.*, 1997). Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (Pifferri et *al.*, 1974).

4.3 Inhibition mixte-type I de la PPO des truffes par le fluorure de sodium

Le type d'inhibition de l'activité catécholase de la PPO de truffe de désert par le fluorure de sodium a été déterminé à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk et les résultats obtenus sont représentés sur la figure 51.

D'après ces représentations, les droites pour l'enzyme non inhibée et pour les deux différentes concentrations de fluorure de sodium se croisent du côté gauche de l'axe $1/V_0$ et au dessus de l'axe $1/[S]$, avec une diminution de V_{max} et inversement une augmentation du

K_m , indiquant que le fluorure de sodium provoque une inhibition mixte-type I pour l'oxydation du catéchol par la PPO de truffe. Par comparaison, le fluorure de sodium a un effet inhibiteur de type compétitif sur la PPO des pommes (Janovitz-Klapp et *al.*, 1990) et un effet mixte type-II sur la PPO de champignon (Gouzi et *al.*, 2010).

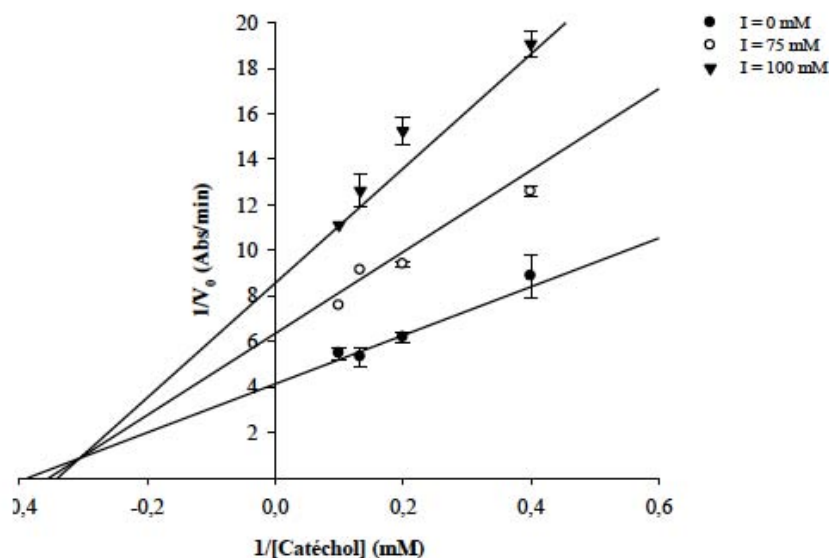


Figure 51: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de la truffe du désert sur le pyrocatechol par le fluorure de sodium. Concentrations de fluorure de sodium sont : 0 (●), 75 (○) et 100 mM (▲).

4.4. Détermination des valeurs d' IC_{50}

L'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque, du fluorure de sodium, de l'azide de sodium sur l'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) a été étudié. Chacun de ces inhibiteurs montre un effet inhibiteur concentration-dépendant sur l'activité diphénol oxydase.

Les figures 52, 53 et 54 représentent respectivement le pourcentage d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque, l'azide de sodium et le fluorure de sodium. L'activité catécholase diminue significativement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur. Afin de comparer entre le pouvoir des différents inhibiteurs (Neeley et *al.*, 2009), leurs valeurs d' IC_{50} , définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%, ont été déterminées dans les mêmes conditions.

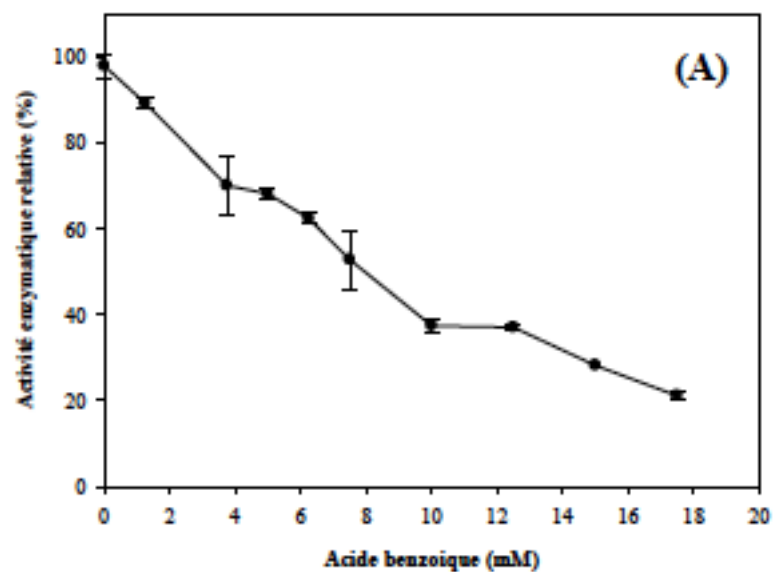


Figure 52: Effet de la concentration de l'acide benzoïque sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de *Terfezia leonis*.

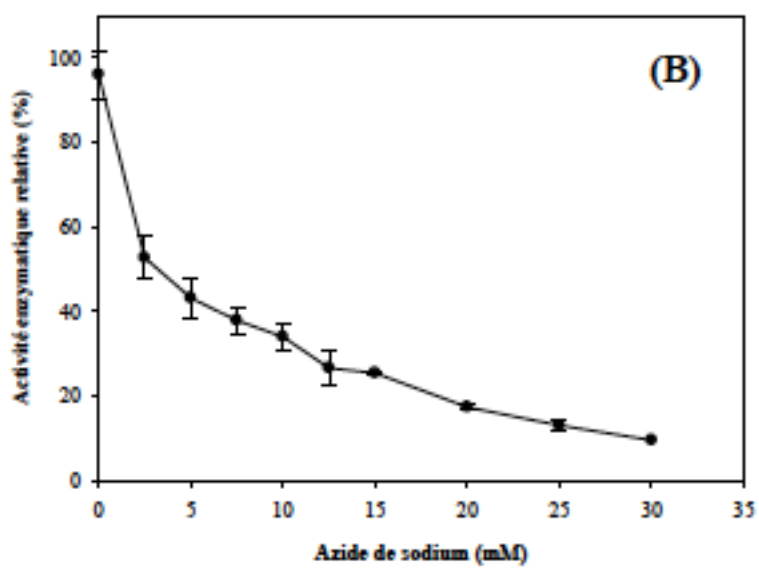


Figure 53: Effet de la concentration de l'azide de sodium sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de *Terfezia leonis*.

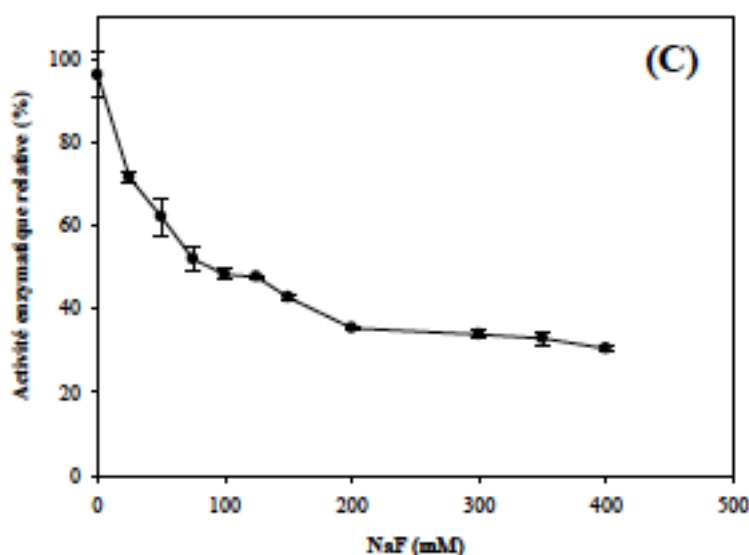


Figure 54: Effet de la concentration du fluorure de sodium sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de *Terfezia leonis*.

Les résultats obtenus montre que l'azide de sodium est le plus puissant ($IC_{50} = 3.11$ mM), suivi par l'acide benzoïque ($IC_{50} = 8.2$ mM). Par contre, le fluorure de sodium ($IC_{50} = 94.45$ mM) est l'inhibiteur le plus faible. Il est intéressant de constater que le pouvoir des inhibiteurs utilisés sur l'activité catécholase de la PPO de truffes décroît selon le même ordre que pour l'extrait de champignon de couche étudié dans le chapitre précédent (Tableau 18). Il faut néanmoins noter que l' IC_{50} pour l'acide benzoïque est très différent pour les deux systèmes. L'extrait de truffe étant moins purifié, on peut s'attendre à ce qu'il soit mieux protégé contre les inhibiteurs

Tableau 18: Les valeurs d' IC_{50} déterminées pour l'inhibition de l'activité catécholase des PPOs avec le pyrocatechol comme substrat.

Inhibiteurs	Sources	IC_{50} (mM)
Acide benzoïque	Truffe (<i>Terfezia leonis</i>)	8.2
	Champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	0.147
Azide de sodium	Truffe (<i>Terfezia leonis</i>)	3.11
	Champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	3.20
Fluorure de sodium	Truffe (<i>Terfezia leonis</i>)	94.45
	Champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	123.94

Tableau 19: Tableau récapitulatif de la purification partielle de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par la méthode "Three phases partitioning".

Etapas de purification	Volume total (ml)	Activité enzymatique (UI/ml)		Protéines (mg/ml)	Activité spécifique (UE/mg)		Rendement (%)		Taux de purification (n-fois)		Rapport Cat/Cre
		Cre	Cat		Cre	Cat	Cre	Cat	Cre	Cat	
Extrait brut	25	0.733	0.944	2.86	0.256	0.330	100	100	1	1	1.29
Three Phase Partitioning	1.98	4.04	19.14	11.98	0.337	1.597	43.60	160.55	1.31	4.84	4.73

Cre : Crésolase, Cat : Catécholase

5. Purification de la PPO de truffe de désert par la méthode de partage en trois phase « Three phases partitioning method »

A la fin de notre étude, nous avons cherché à purifier l'extrait de truffe du désert contenant la PPO. La méthode basée sur le partage en trois phases avec le t-butanol comme solvant organique (Dennison et Lovrien, 1997) s'est avérée rapide, très simple et efficace. Cette technique nous a permis d'obtenir un extrait riche en PPO qui oxyde la L-tyrosine et le pyrocatechol.

Les activités crésolase et catécholase sont respectivement, 1.058 et 8.76 UI/mL (Tableau 19). La méthode de « Three Phase Partitioning » résulte d'une augmentation de l'activité spécifique avec un taux de purification de 4.84-fois et d'un rendement global d'activité de 160.55%. L'augmentation de l'activité PPO totale après Three Phase Partitioning peut être attribuée à l'élimination de quelques composés de poids moléculaire faible tels que les lipides, les composés phénoliques et les détergents par le t-butanol (Dennison et Lovrein, 1997). Plusieurs auteurs ont obtenu des taux de purification de la PPO extraite à partir de différentes sources végétales compris entre 4.84 à 8-fois par cette méthode. Par exemple, Busra Ozer et *al.* (2010) ont pu purifier 8.6-fois l'extrait brut de la PPO obtenu à partir de la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

6. Bilan

En comparant les deux extraits que nous avons étudiés dans ce travail, et en nous focalisant sur l'activité catécholase en présence de pyrocatechol (Tableau 20), nous pouvons constater qu'ils varient significativement en terme d'activité spécifique et de (K_m , K_s). Ceci est avant tout dû à la différence en terme de purification des systèmes et il sera donc intéressant, dans la suite de ce travail, d'étudier l'extrait purifié présenté ci-dessus. On peut néanmoins noter que cette différence n'a pas un effet notable sur le comportement thermique des activités enzymatiques.

Tableau 20 : comparaison des données obtenues pour l'activité catécholase dans les deux extraits étudiés en présence de catéchol.

	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Terfezia leonis</i>
Protéine totale (mg.mL ⁻¹)	4.8	2.9
Activité spécifique (UE.mg ⁻¹)	40.1	0.33
pH optimal	7	7
K_m (mM)	0.4	2.4
K_s (mM)	270	150
Z_T (°C)	10.1	10.8
E_a (kJ.mol ⁻¹)	210	190

Chapitre 5. Immobilisation de PPO pour la mise au point de biocapteurs et bioréacteurs

(2 publications internationales)

Chapitre 5. Immobilisation de PPO pour la mise au point de biocapteurs et bioréacteurs

L'un des objectifs initiaux de ce travail de thèse était l'immobilisation d'extraits de PPOs par voie sol-gel pour réaliser des biocapteurs. Ce projet se basait sur l'idée que l'utilisation d'un extrait, plutôt qu'une protéine purifiée, permettait de diminuer les coûts des dispositifs. De plus, on pouvait espérer que la présence d'autres molécules dans l'extrait puisse participer à la stabilisation de l'enzyme une fois confinée dans un support solide. Malheureusement, pour des raisons administratives, cette partie de la thèse n'a pu progresser aussi vite que nous le souhaitions. Nous avons donc aussi exploré la possibilité de réaliser des bioréacteurs en utilisant des matrices d'immobilisation à base de biopolymères.

1. Développement d'un biocapteur optique à PPO de truffe pour le dosage de la dopamine

1.1. Point de départ

Si la technologie de bio-immobilisation de biomolécules par voie sol-gel a été développée depuis plusieurs années, un certain nombre d'enjeux subsiste (Avnir et al., 2006). En particulier, la mise au point de films minces de silice qui soient stables en solution est rendue complexe par le fait que le procédé de déposition à partir de précurseurs en solution mène à des réseaux peu condensés. Pour d'autres applications, il est possible d'appliquer un traitement chimique ou thermique pour améliorer la stabilité des films, ou de procéder par voie gaz. Néanmoins, en présence d'espèces biologiques, et en particulier de cellules, les conditions opératoires adéquates sont beaucoup plus restreintes.

Notre équipe a récemment mis au point un procédé de dépôt couche par couche de films de silice par une voie aqueuse, compatible avec la survie de bactéries mais qui s'est avérée très sensible aux conditions de stockage (Depagne et al., 2012). Des essais pour utiliser ces dépôts pour l'immobilisation d'enzymes et d'anticorps a montré d'une part que le procédé était très dépendant de l'espèce encapsulée et d'autre part que l'ajout d'un additif, tel le glycérol, permettait de limiter la fuite des espèces hors du film, probablement en bouchant les pores du réseau (Moreau et al., 2013). Le lecteur pourra se reporter à cette publication en ce qui concerne la caractérisation des films de silice.

Le travail présenté ici s'est effectué en parallèle de ces développements et n'a pu donc profiter des optimisations réalisées au cours du temps. Néanmoins, comme nous allons le voir, les résultats obtenus confirment les tendances identifiées par T. Moreau. En ce qui concerne le choix de l'extrait encapsulé, et dans la mesure où nous recherchions le système le moins purifié possible, nous nous sommes orienté vers l'extrait de truffe du désert. Ce

système présente aussi l'avantage d'avoir un pH d'activité optimum en milieu légèrement acide, et donc dans des conditions plus favorables à la stabilité de la silice (dont la solubilité augmente avec le pH au-delà de pH 3-4). En ce qui concerne le substrat, nous nous sommes intéressés à la dopamine, un neuro-transmetteur, dont la détection via l'activité des PPOs a déjà été proposée (Njagi et al. 2010 ; Park et al. 2010).

1.2. Etudes préliminaires

Il était important, dans un premier temps, d'étudier le comportement de l'extrait de PPO en présence de la dopamine. Il nous a aussi semblé intéressant de comparer ces données à celles obtenues pour une tyrosinase commerciale. Comme le montre la figure 55, l'extrait de truffe présente à nouveau un maximum d'activité autour de pH 5. Il est d'ailleurs plus marqué que celui observé en présence de tyrosine. Par comparaison, la tyrosine commerciale montre une activité maximale en conditions de pH neutre.

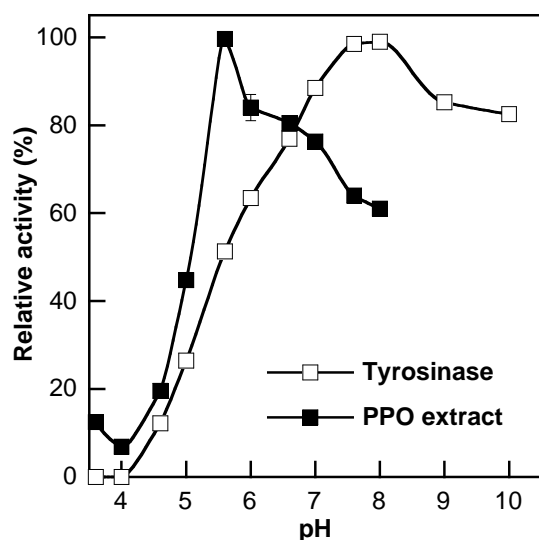


Figure 55 : Influence du pH sur l'activité d'oxydation de la dopamine pour l'extrait de truffe du désert et une tyrosinase commerciale

La stabilité thermique de ces deux systèmes a aussi été étudiée après 10 minutes, montrant une légère amélioration de préservation d'activité entre 40°C et 55°C au sein de l'extrait (Figure 56).

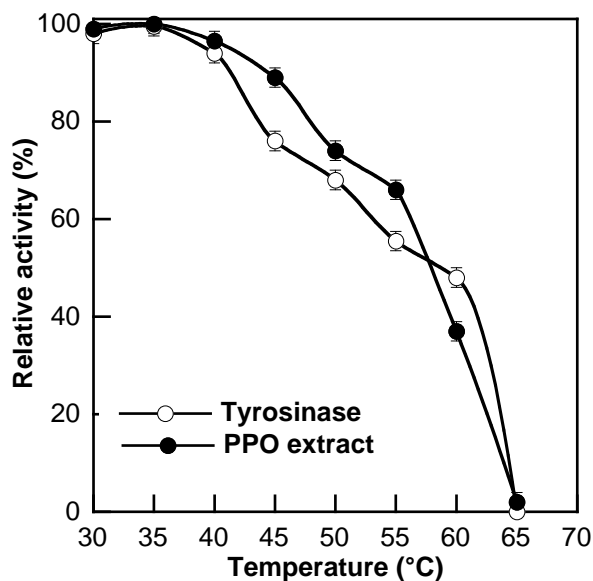


Figure 56 : Influence de la température sur l'activité d'oxydation de la dopamine pour l'extrait de truffe du désert et une tyrosinase commerciale

Enfin, les paramètres cinétiques de l'activité enzymatique ont été déterminés. Comme le montre la figure 57, l'activité enzymatique augmente avec la concentration en dopamine jusqu'à environ 7.5 mM-10 mM, puis diminue. Ce phénomène déjà observé pour les PPOs de champignon et de truffe dans les chapitres précédents, indique une inhibition « suicide » par excès de substrat ou de produit.

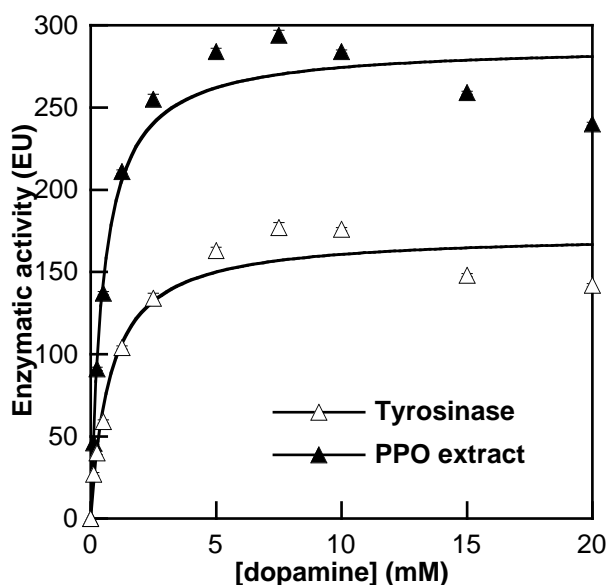


Figure 57 : Influence de la concentration en dopamine sur l'activité d'oxydation de l'extrait de truffe du désert et une tyrosinase commerciale.

Les valeurs de K_m obtenues après linéarisation sont 0.5 ± 0.1 mM and 0.9 ± 0.1 mM l'extrait de PPO et la tyrosinase commerciale.

1.3. Mise en place du procédé

L'encapsulation de l'extrait de truffe dans les films de silice a ensuite été étudiée. Nous avons tout d'abord vérifié que la PPO immobilisée dans les films de silice conservait son activité enzymatique. La figure 58 montre une cinétique d'oxydation de la dopamine par la PPO de *Terfezia leonis* immobilisée par encapsulation deux couches de silice.

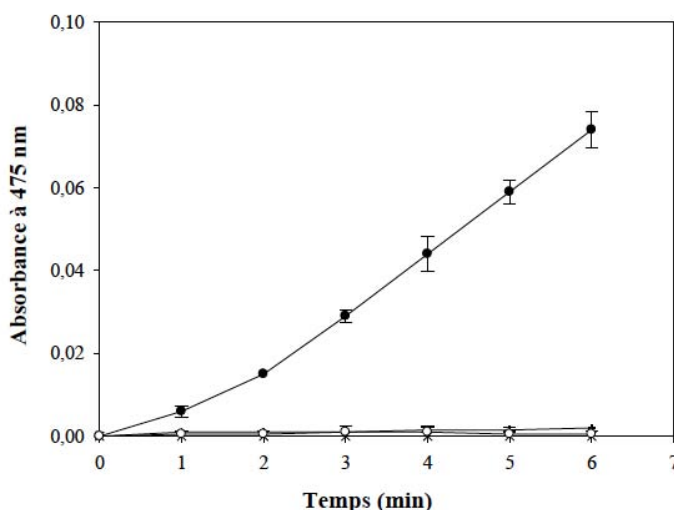


Figure 58 : Suivi de l'activité enzymatique en présence de L-dopamine (●) de l'extrait de truffe du désert immobilisé dans deux couches de silice, (○) du surnageant du film et (□) du film de silice seul.

Ce résultat indique que la quantité d'enzyme relarguée après formation du film est négligeable et que le gel de silice ne contribue pas de façon significative à l'oxydation de la dopamine.

Des essais ont aussi été réalisés pour immobiliser la tyrosinase commerciale dans les films de silice mais les données obtenues n'étaient pas satisfaisantes. Une première raison peut être que cette enzyme purifiée n'est accompagnée d'aucune autre molécule qui pourrait ralentir son relargage. Une autre possibilité est que, dans ce cas, la mesure est effectuée à pH 7 qui est l'optimum d'activité pour cette enzyme mais qui correspond aussi à un domaine de moindre stabilité de la silice. Sur cette base, la suite de l'étude a été effectuée uniquement sur l'extrait de truffe.

Nous avons aussi cherché à déterminer le nombre de couches de silice contenant des enzymes qui pouvaient être déposées. Comme le montre la figure 59, la vitesse initiale d'oxydation augmente de façon linéaire avec le nombre de dépôts. Néanmoins, nous avons constaté que la reproductibilité de nos mesures était aussi fortement affectée par la

superposition des films. Pour cette raison, la suite de l'étude a été effectuée sur deux couches uniquement.

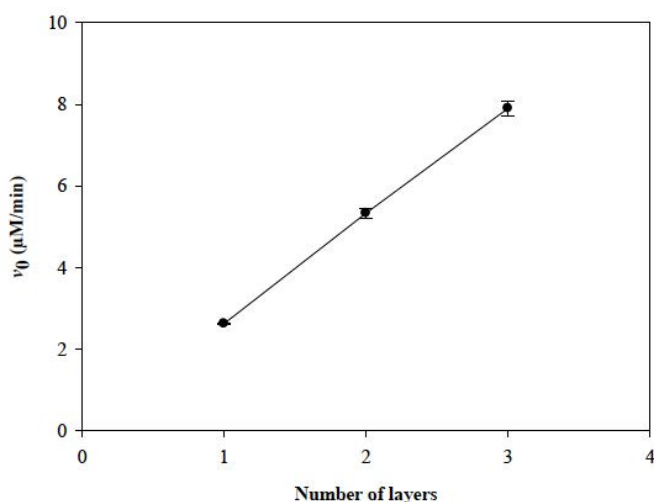


Figure 59 : Effet du nombre de couches de silice contenant l'extrait de PPO sur la vitesse initiale d'oxydation de la dopamine à pH 5.

1.4. Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique de l'extrait de truffe

L'effet du pH sur la vitesse initiale d'oxydation de la L-dopamine à 2 mM par la PPO de truffe de désert immobilisée dans le gel de silice a été étudié. Les résultats indiqués dans la figure 60 montrent que l'activité de la PPO immobilisée dans la silice est optimale dans une large gamme de pH compris entre 5.6 à 7. La figure 60 montre une augmentation de l'activité entre 30°C et 50°C environ.

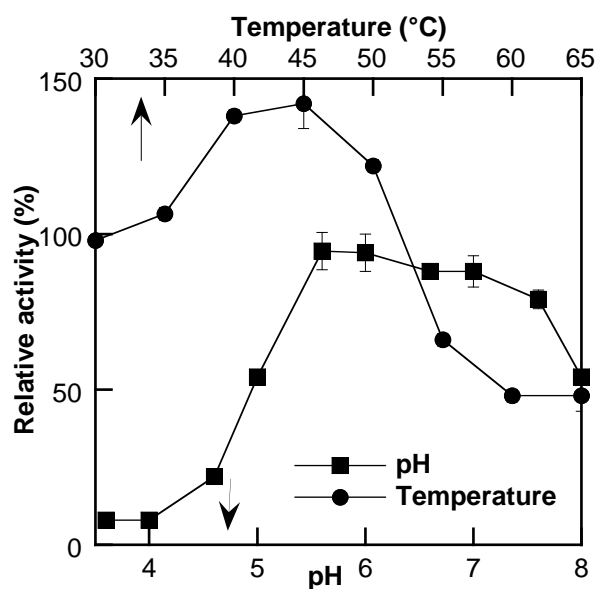


Figure 60 : Effet du pH et de la température sur l'activité d'oxydation de la dopamine par l'extrait de truffe immobilisé dans deux couches de silice

Enfin, les paramètres cinétiques de l'enzyme immobilisée ont été étudiés. La figure 61 montre que le phénomène d'inhibition suicide a lieu à une concentration inférieure à l'enzyme libre (4 mM). La valeur de K_m calculée est de $0.2 \text{ mM} \pm 0.1 \text{ mM}$, et donc peu différente de celle de l'extrait en solution

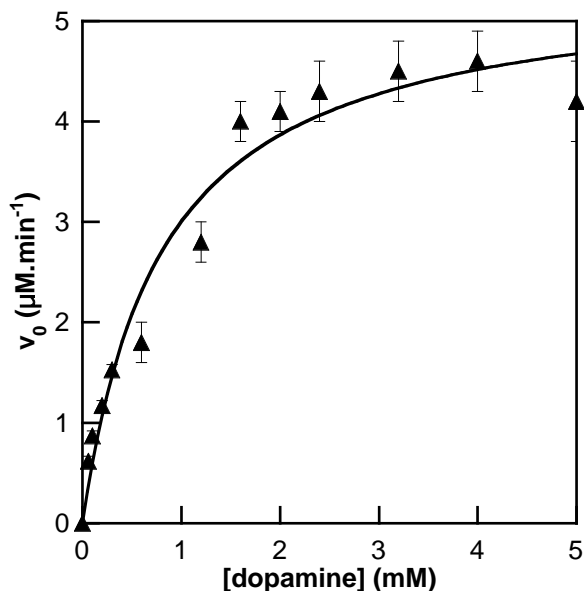


Figure 61 : Influence de la concentration en dopamine sur l'activité d'oxydation de l'extrait de truffe du désert immobilisé

L'ensemble des données obtenues est en bon accord avec la littérature. D'une part, l'augmentation de la gamme de stabilité de pH de l'enzyme a été attribuée au rôle de tampon joué par les groupements silanols de la surface du gel de silice (Frenkel-Mullerad and Avnir, 2005). D'autre part, l'augmentation de la stabilité thermique est liée au confinement de l'enzyme qui limite ses possibilités de dépliements pour cause de gêne stérique (Livage et al. 2001).

Néanmoins, un autre phénomène semble intervenir ici, comme le démontre l'augmentation de l'activité avec la température. Cet effet a déjà été observé avec des PPOs en solution et avec d'autres enzymes immobilisées. Il a été suggéré que l'enzyme existe sous une forme inactive (latente) et une forme active, l'équilibre entre les deux étant régulé par la température. Il faut se rappeler que dans notre extrait l'enzyme est sous forme inactive et qu'elle ne présente une activité qu'en présence d'un agent d'activation, le SDS. Il est donc possible de suggérer que la température favorise l'action du SDS sur l'accessibilité du site actif de l'enzyme. Cet effet pourrait aussi être favorisé par le confinement du système enzyme+SDS au sein du gel. Notamment, le confinement pourrait aussi expliquer que des valeurs inférieures de dopamine sont suffisantes pour observer l'inhibition suicide.

1.5 Performances du biocapteur

Le premier paramètre à étudier pour évaluer les performances de notre système en tant que biocapteur est le domaine de linéarité de la détection. La figure 62 montre qu'une réponse optique fiable et linéaire est obtenue pour des concentrations en dopamine entre 0.1 mM et 1.5 mM

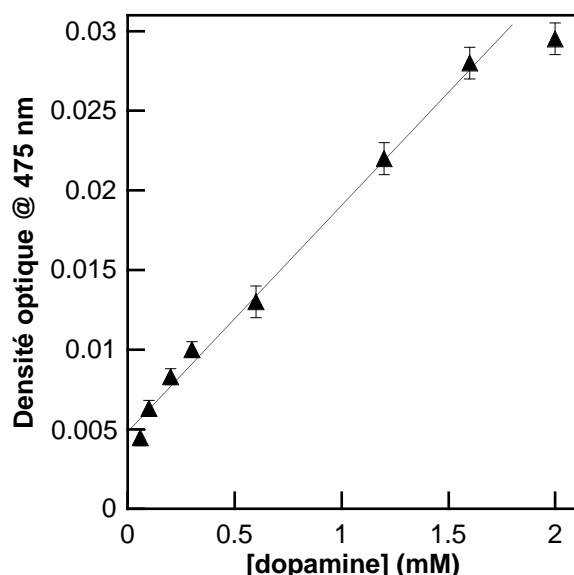


Figure 62 : Réponse optique en fonction de la quantité de dopamine pour l'extrait PPO de la truffe du désert immobilisée dans deux couches de silice

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres chercheurs. Le biocapteur optique à base de d'homogénat de coing développé par Sezgintürk et ces collaborateurs (2010) permet également de détecter des concentrations de dopamine comprises entre 5 à 200 μ M. De plus Fiorentino et *al.* (2010) ont développé un biocapteur optique à plusieurs couches de PPO de champignon *Agaricus bisporus* immobilisée dans un polymère cationique (poly(dimethyldiallylammonium chloride)) pour le dosage de la L-dopamine. Ce biocapteur permet de détecter des concentrations de dopamine comprises entre 23 et 350 μ M.

La réutilisation de l'enzyme immobilisée est aussi l'un des plus importants facteurs influençant son utilisation (Kocaturk et Yagar, 2010). La figure 63 montre les résultats de l'utilisation répétée en mode discontinu du biocapteur en présence d'une solution de dopamine à 2 mM. Une diminution significative de la réponse du biocapteur a été constatée pendant son second cycle d'utilisation. Seulement 40% de l'activité de la PPO immobilisée est retenue par rapport à son activité initiale après 3 cycles de réutilisation. Cette diminution de l'activité enzymatique peut être expliquée par l'inactivation irréversible de la PPO par l'o-benzoquinone ou bien par la dopamine (Dietler et Lerch, 1982 ; Kocaturk et Yagar, 2010).

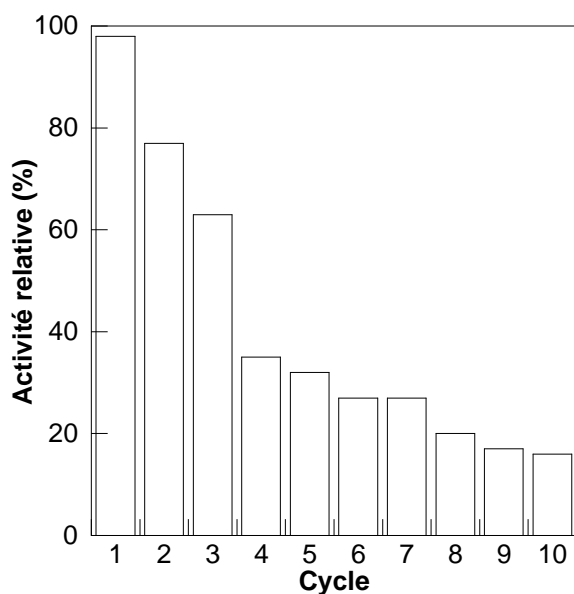


Figure 63 : Evolution de l'activité enzymatique de l'extrait encapsulé au cours des cycles de réutilisations

1.6. Bilan

Ces résultats démontrent que l'extrait de truffe contenant de la PPO est une source intéressante pour la réalisation d'un biocapteur pour la détection de dopamine. En particulier, le fait qu'il fonctionne de façon optimal à pH 5 lui permet d'être plus adapté que l'enzyme commercial à son immobilisation dans des films de silice.

2. Développement d'un bioréacteur à PPO de champignon de couche pour la dégradation du phénol

2.1 Détermination des paramètres cinétiques de la PPO libre et immobilisée

Les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de l'oxydation du phénol par l'extrait d'*Agaricus bisporus* a été étudié à pH 6,0, utilisant le tampon phosphate à 0.05 M et à 35°C. Nous avons observé que l'enzyme oxyde significativement le phénol dans la gamme des concentrations de substrats comprise entre 0.5 et 10 mM.

La figure 64 montre que la cinétique d'oxydation du phénol par l'enzyme libre suit bien le modèle cinétique de Michaelis-Menten. Les paramètres cinétiques de la PPO libre estimés à partir de l'analyse du graphique de Lineweaver-Burk sont $V_m = 0.14$ Abs/min et $K_m = 0.56$ mM. Fenoll et *al.* (2002) ont trouvé que la constante de Michaelis-Menten (K_m) pour le phénol égale 0.70 mM, utilisant la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) purifiée. On constate donc que la PPO qu'elle soit brute ou purifiée donne des résultats comparables.

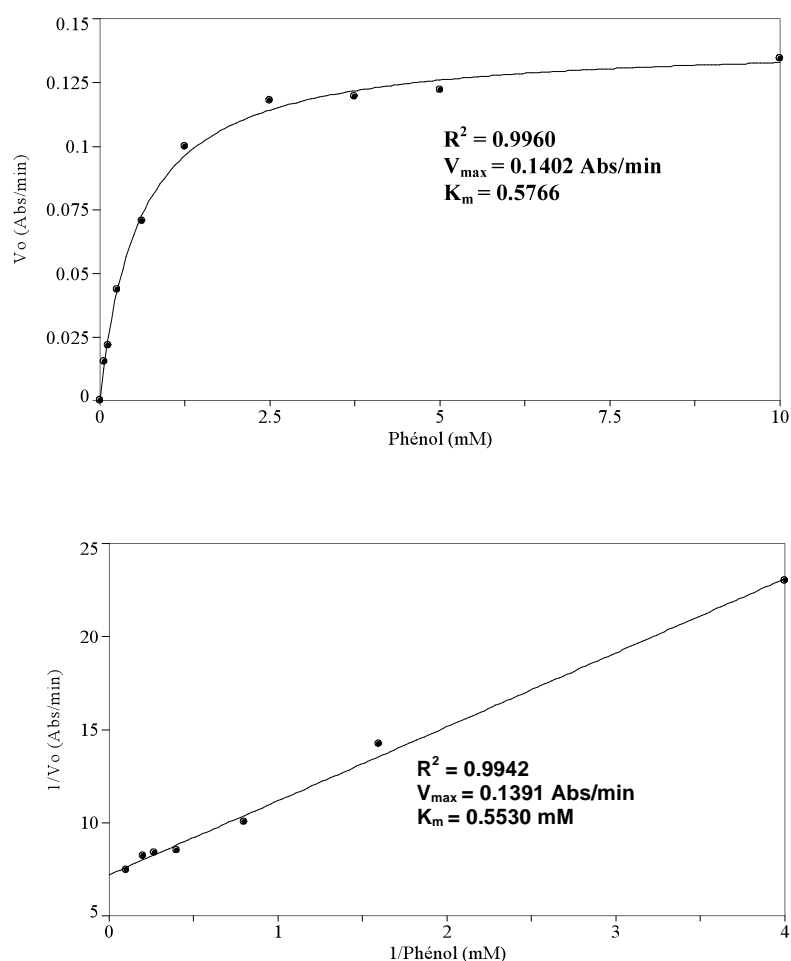


Figure 64: Effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la PPO libre du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (pH 6.0 ; 35°C). (haut) Représentation graphique de Michaelis-Menten, (bas) Représentation graphique de Lineweaver-Burk.

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité de la PPO immobilisée par inclusion dans le gel d'alginate de calcium à 2,5% a été étudié dans une gamme de concentration en phénol comprise entre 0.5 à 10 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 6, 0 à 35°C). Nous avons observé que la PPO immobilisée est sujette à un phénomène d'inhibition pour des concentrations de substrat supérieures à 5 mM. Par conséquent, nos résultats expérimentaux ont été ajustés par deux équations non linéaires. Les valeurs des paramètres cinétiques V_{\max} , K_m et K_s ont été calculées. La figure 65 indique que la PPO immobilisée dans le gel d'alginate de calcium suit correctement un modèle cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat. L'activité enzymatique augmente avec l'augmentation de la concentration du phénol pour atteindre un maximum à 5

mM, au-delà de laquelle l'activité enzymatique diminue. Cette diminution d'activité enzymatique aux fortes concentrations de substrat peut être expliquée également par l'effet inhibiteur du produit (o-quinone) qui s'accumule dans le microenvironnement. L'immobilisation de la PPO provoque une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le phénol ($K_m = 1 \text{ mM}$) et une diminution de son activité catalytique ($V_{\max} = 0.005 \text{ Abs/min}$). Plus précisément, la valeur du K_m apparente de la PPO immobilisée est environ deux fois élevée par rapport à celle de l'enzyme libre. Par contre, la valeur du V_{\max} de l'enzyme libre est 30 fois plus grande à celle de la PPO immobilisée.

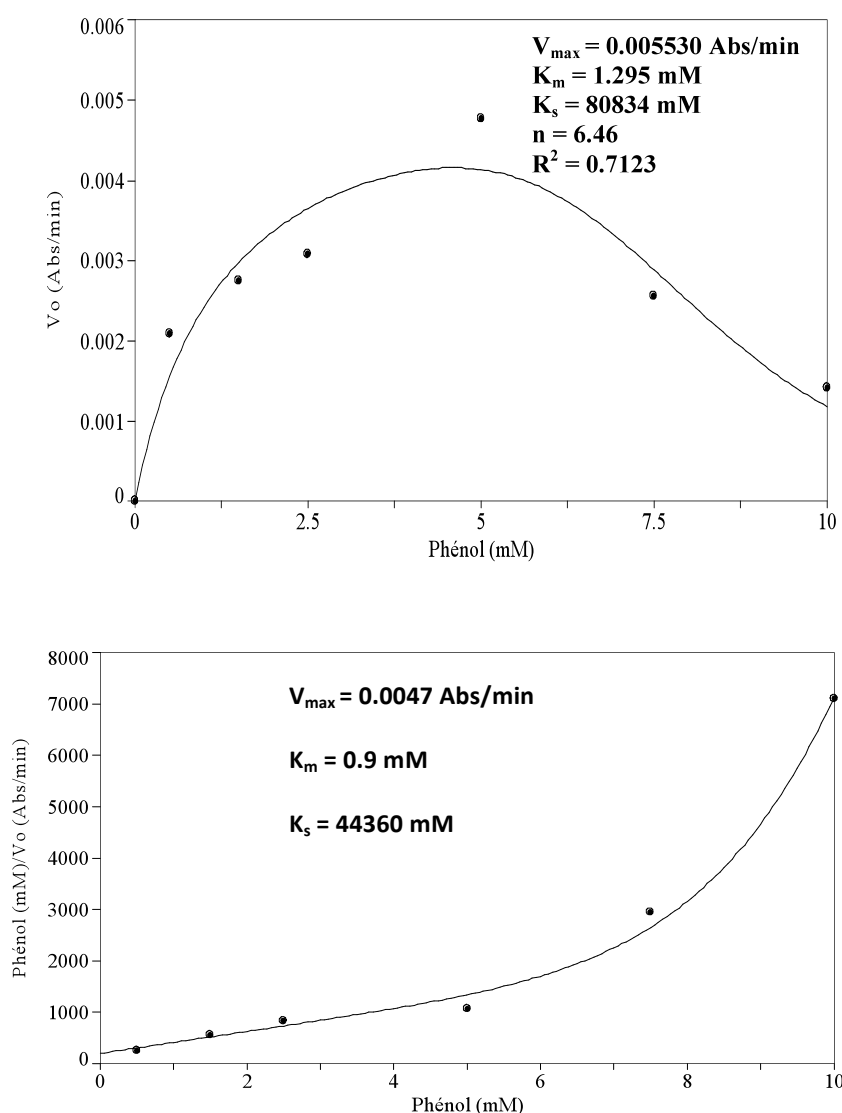


Figure 65: Etude de l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale de l'oxydation du phénol par la PPO immobilisée dans le gel d'alginate de calcium à 2.5% (diamètre des billes 2.6 mm, pH 6 (tampon acétate de sodium 0.05 M), et à 35°C) (haut) Représentation graphique de Michaelis-Menten ; (bas) Représentation graphique de Lineweaver-Burk.

L'augmentation du K_m peut être due d'une part au changement de la conformation structurale de l'enzyme au cours du procédé d'immobilisation et d'autre part à la diminution de l'accessibilité du substrat à son site actif. De plus, la présence des charges électriques sur le support et sur le substrat se traduira par une variation de la constante de Michaelis-Menten apparente de l'enzyme immobilisée qui augmentera si les deux charges ont le même signe et diminuera si elles sont de signe opposé (Durand et Monson, 1974). En parallèle, un abaissement de la diffusion du substrat aussi bien que du produit à l'intérieur et à l'extérieur des billes d'alginate (Vu et *al.*, 2008), provoquent un ralentissement de la réaction et par conséquent la diminution de V_{max} .

Comme le montre la figure 65, la représentation graphique de $(S)/v$ en fonction de (S) suit une loi hyperbolique, la courbe devenant concave vers le haut aux valeurs élevées de (S) , où $(S)/K_s$ n'est plus négligeable. Il s'avère que le substrat à des concentrations élevées, peut empêcher sa propre conversion en produit (Chaplin and Bucke, 1990). Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction, et parfois à la compétition entre le produit et le substrat (Mayer et Harel, 1994). Comme déjà observé pour l'immobilisation de la PPO de truffe dans la silice, le confinement de l'enzyme semble contribuer à renforcer cet effet d'inhibition, du fait que le produit de la réaction s'accumule à proximité du site actif.

2.2 Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation du phénol par la PPO libre et immobilisée a été étudié sur différentes dilutions de l'extrait qui varient entre 0,2-1ml et 0.25-2ml pour l'enzyme libre et immobilisée respectivement. Les essais sont réalisés dans les conditions standards dont la concentration du phénol est 2.5 mM.

La figure 66 montre que les vitesses initiales du phénol par la PPO libre et par la PPO immobilisée sont directement proportionnelles à la quantité d'enzyme introduite. D'une façon générale, il ya une relation linéaire entre la concentration de la PPO et la vitesse initiale pour les deux formes d'enzymes (libre et immobilisée). La proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration en enzyme a une importance dans la pratique car elle permet d'estimer sa concentration dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale (Weil, 2001).

A partir de la relation de proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration de l'enzyme, on détermine habituellement la constante catalytique. Néanmoins, nous ne connaissons pas ici la concentration molaire de l'enzyme et nous ne pouvons donc pas calculer K_{cat} .

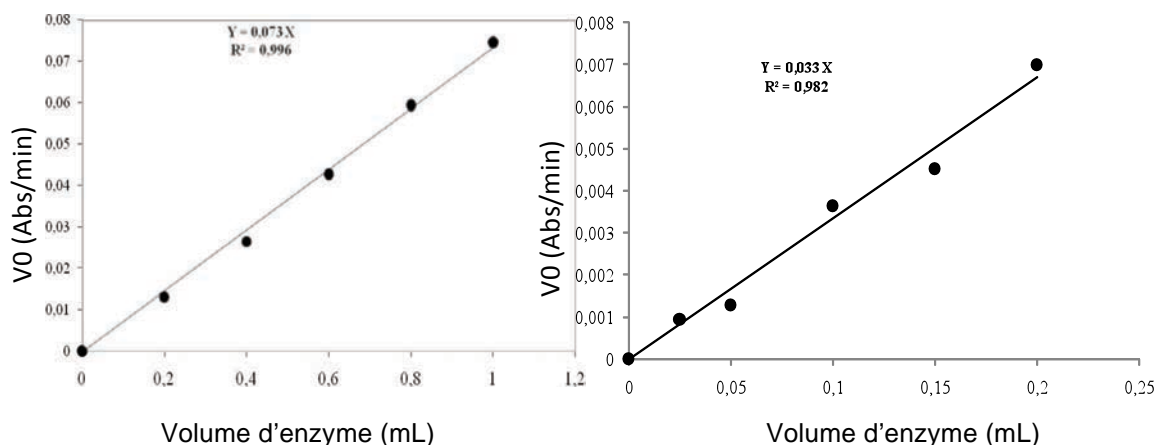


Figure 66: Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la PPO libre (gauche) et immobilisée (droite) (pH 6,0, 35°C ; phénol 2.5 mM).

2.3 Effet du pH

L'effet de pH sur l'activité enzymatique de la PPO libre et immobilisée a été déterminé par une série d'expériences en mesurant la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du phénol à différents pH : acétate de sodium (0,05M) entre les pH 4 et 5,6 et phosphate de sodium (0,05M) entre les pH 6,0 et 8,0, tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants. La figure 67 montre l'influence du pH sur l'activité de la PPO libre et immobilisée. Le graphe à une allure globale classique en forme de cloche.

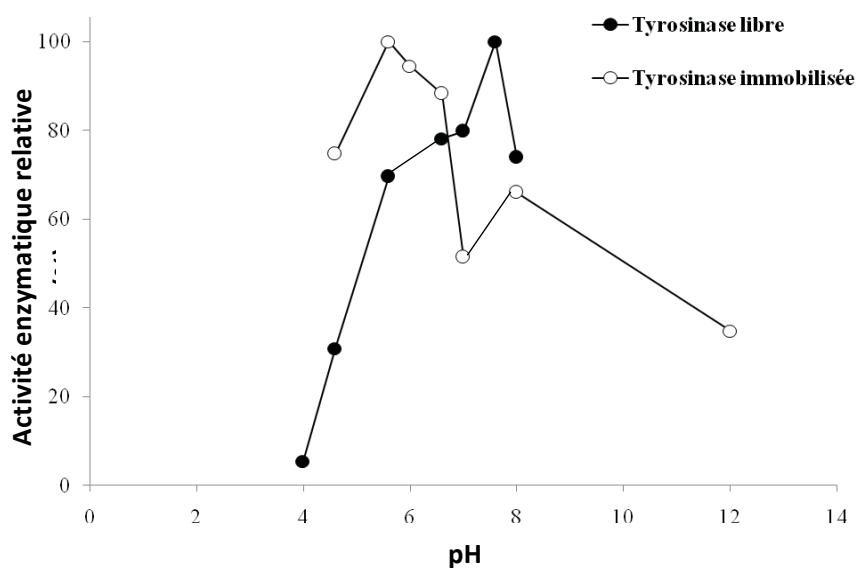


Figure 67: Effet du pH sur l'activité de la PPO libre et de la PPO immobilisée (phénol à 2.5 mM ; 35°C).

L'activité enzymatique maximale est marquée aux pH 5.5-7.5 pour la PPO immobilisée et la PPO libre, respectivement. Ce déplacement du pH optimal de deux unités vers le domaine acide peut être expliqué par l'effet répulsif entre le support d'immobilisation chargé négativement et l'ion phénolate aux pH alcalins limitant ainsi la diffusion du substrat.

2.4 Stabilité thermique

La stabilité thermique a été étudiée après incubation de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée à des températures comprises entre 30 et 70°C pendant 10 min en absence du substrat. Les préparations enzymatiques sont ensuite équilibrées à 30°C afin de déterminer l'activité résiduelle aux conditions standards. D'après la figure 68, on ne remarque pas une différence très marquée entre les deux systèmes.

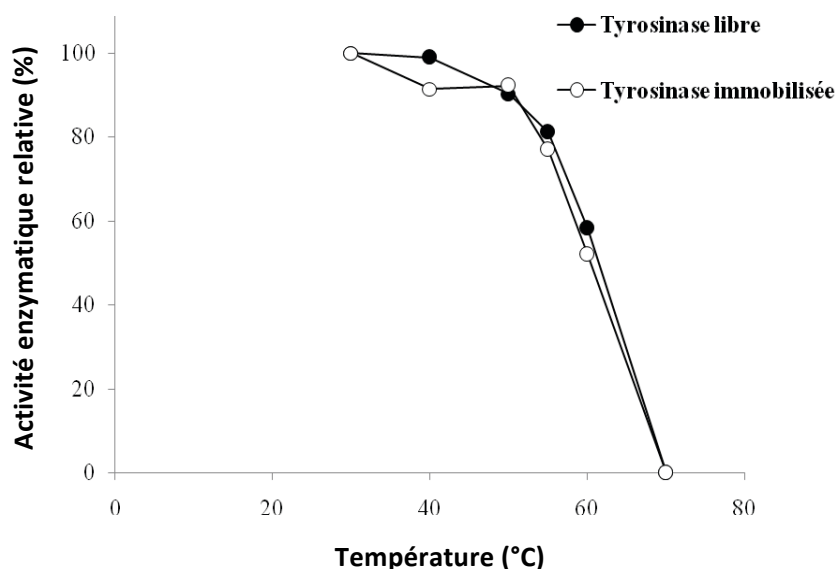


Figure 68: Stabilité thermique de la PPO libre et de la PPO immobilisée après une durée d'incubation 10 mn à chaque température (phénol à 2,5 mM; pH 6,0)

2.5 Etude de la stabilité opérationnelle

La perte de l'activité catalytique de la PPO immobilisée au cours de sa réutilisation a été étudiée. Malgré sa faible activité par rapport à l'enzyme libre, le gel d'alginate de calcium offre les avantages d'une manipulation aisée et d'un retrait facile de l'enzyme du milieu réactionnel.

D'après la figure 69, on constate que l'activité de l'enzyme immobilisée varie en fonction du cycle d'utilisation. L'activité de la PPO immobilisée augmente presque deux fois après son deuxième cycle d'utilisation. Après le cinquième cycle de réutilisation des billes d'alginate de calcium contenant la PPO immobilisée, l'activité enzymatique revient à sa valeur initiale.

On a constaté qu'après 2 cycles de réutilisation, le diamètre des billes d'alginate a augmenté suite au gonflement du gel, ce qui accélère la diffusion interne du substrat et l'accessibilité à l'enzyme (Figure 70). Par conséquent, l'activité enzymatique peut être apparemment augmentée. L'activité de l'enzyme immobilisée revient à sa valeur initiale à partir du 3^{ème} cycle, probablement à cause de l'effet inhibiteur des *o*-quinones qui s'accumulent à l'intérieur du gel d'alginate, comme le montre la coloration des billes (Figure 70)

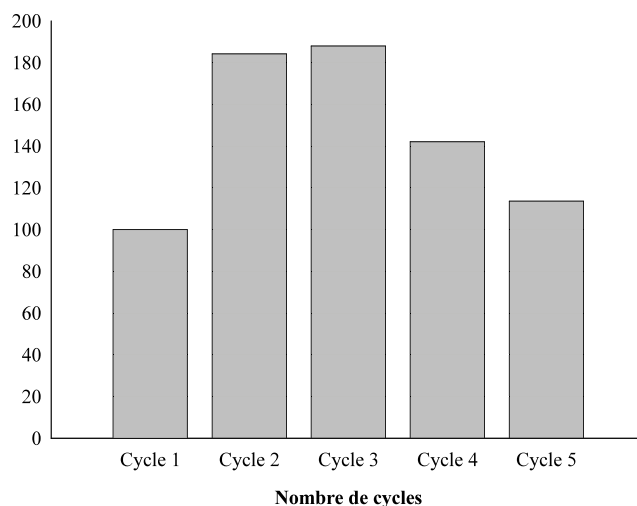
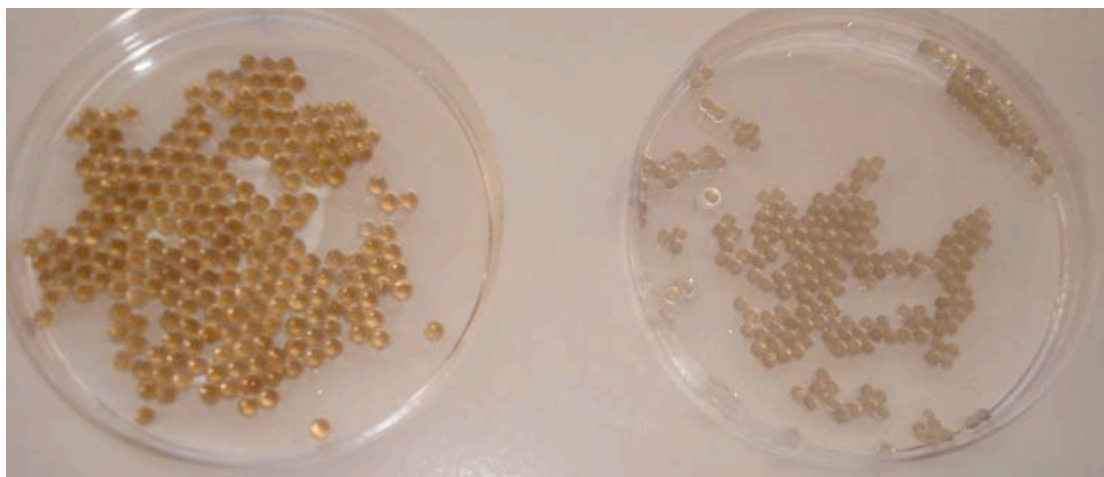


Figure 69: Stabilité de l'activité de la PPO immobilisée après son réutilisation pour l'oxydation du phénol à 2.5 mM.



5 cycles de réutilisation de la PPO immobilisée.

1 cycle de réutilisation de la PPO immobilisée.

Figure 70: L'aspect des billes d'alginate récupérées après recyclage de la PPO immobilisée.

2.6 Bilan

Ces premiers résultats sont assez encourageants, en particulier en terme de cyclabilité. Il est intéressant de comparer les résultats obtenus avec la silice et l'alginate. La matrice inorganique montre l'avantage d'augmenter la stabilité thermique de l'enzyme du fait de sa dureté qui limite les ré-arrangements de la protéine alors que la flexibilité du réseau d'alginate ne lui confère pas cette capacité. En terme de pH, les deux systèmes modifient notablement les conditions optimales de fonctionnement du fait des propriétés acide-base des supports. Néanmoins, les valeurs de K_m ne sont que peu modifiées par l'encapsulation.

Un aspect important de ces résultats est lié à la présence d'une inhibition par excès de substrat ou de produit qui est exacerbé par l'immobilisation dans les deux systèmes. Cet effet démontre que le contrôle des flux à travers les matériaux doit être mieux maîtrisé. On pourrait penser augmenter la porosité des réseaux hôtes mais cela conduirait à un relargage plus important de l'enzyme. L'autre possibilité est d'effectuer ces expériences en flux continu afin de favoriser les cinétiques de diffusion. Cette approche paraît en particulier particulièrement adaptée pour la réalisation des bioréacteurs. Enfin, sur la base des systèmes étudiés ici, il serait intéressant d'étudier des matériaux silice-alginate afin de réunir des propriétés de stabilisation de la silice avec les capacités de recyclage de l'alginate.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Parmi les effecteurs qui interviennent dans le brunissement des champignons et de nombreux autres produits végétaux, la polyphénol oxydase joue un rôle essentiel. La PPO met en jeu deux activités enzymatiques : les activités crésolase et catécholase. Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse s'est focalisé d'une part sur la caractérisation des PPOs extraites à partir de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) et de la truffe de désert (*Terfezia leonis*) et d'autre part sur le développement de matériaux pour le dosage de la L-dopamine et la dégradation du phénol en solution.

Les méthodes d'extraction et de purification partielle des PPOs à partir de ces champignons se sont avérés simples à mettre en œuvre et nous ont permis d'obtenir des extraits enzymatiques riches en PPO et également très stables. L'avantage principal de ces méthodes est de préserver les deux activités, crésolase et catécholase, de la PPO.

L'activité crésolase de la truffe est complètement latente et nécessite la présence de SDS pour être activée tandis que celle de la PPO de champignons de Paris est active en absence de ce détergent anionique. L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris est plus élevée par rapport à celles trouvées pour d'autres PPO obtenues à partir de diverses sources végétales. Les activités crésolase et catécholase de la PPO de truffe sont relativement stables pendant plusieurs jours de stockage à -15°C. De même la PPO de champignon de Paris est très stable à cette température mais son activité crésolase est très labile. Les PPOs du champignon de Paris et de la truffe de désert sont capables d'oxyder les mono-, les di- et les triphénols. La L-tyrosine et le pyrocatechol sont leurs meilleurs substrats phénoliques. L'influence de la concentration en pyrocatechol, en pyrogallol et en L-tyrosine sur l'activité enzymatique fait apparaître, outre la réponse michaelienne classique, l'effet inhibiteur d'un excès de substrat. L'activité catécholase des PPOs du champignon de Paris et de la truffe de désert est plus élevée aux pH voisins de la neutralité. Les études de la stabilité thermique de l'activité catécholase des PPOs de champignon de Paris et de la truffe de désert montrent que leur température optimale apparente est comprise entre 30°C et 40°C. Le SDS provoque une augmentation considérable de l'activité de la PPO de truffe mais n'a aucun effet sur la PPO du champignon. La PPO de truffe a une activité crésolase élevée par rapport aux autres sources végétale et présente une phase de latence lorsque la L-tyrosine est utilisée comme substrat monophénolique. Cette activité est maximale aux pH

compris entre 5 et 6 et 45°C. La phase de latence dépend de la concentration de l'enzyme, du pH du milieu et de la concentration du substrat et du SDS.

Les PPO du champignon de Paris et de la truffe de désert ont été efficacement inhibées par les espèces testées. Le type d'inhibition observé dépend étroitement de la source de la PPO. En parallèle l'inactivation thermique des PPOs du champignon de Paris et de la truffe de désert a pu être convenablement décrite par un modèle cinétique de premier ordre. La PPO de truffe semble être plus thermostable par rapport à la PPO de champignon de Paris. Le traitement thermique de courte durée à 70°C est efficace pour inactiver totalement l'enzyme. Il semble donc que l'inhibition chimique et l'inhibition thermique peuvent être considérés comme des moyens efficaces pour le contrôle de brunissement enzymatique de ces champignons.

Dans cette étude un biocapteur optique à PPO de truffe de désert a été développé pour la première fois. La PPO immobilisée par encapsulation dans des couches de silice y est parfaitement retenue. Son activité est optimale dans le domaine de pH acide et semble être plus thermostable par rapport à sa forme soluble. Les conditions optimales du fonctionnement du biocapteur permettent d'avoir une réponse linéaire pour des concentrations élevées de dopamine. Ce biocapteur optique à PPO de truffe de désert est simple à mettre en œuvre, peu coûteux et possède de bonne performance. La PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) a été immobilisée par encapsulation dans des billes d'alginate de calcium. L'enzyme immobilisée catalyse efficacement l'oxydation du phénol en solution à pH neutre et peut être réutilisée. Dans les deux cas, un effet du confinement sur le processus d'inhibition suicide est néanmoins observé.

Les perspectives de ce travail s'articulent dans le cadre d'un projet commun entre les deux équipes qui vise à étudier et valoriser la biomasse végétale endogène aux régions désertiques algériennes. La première approche concerne plus spécifiquement l'extraction et l'étude des PPOs issues de la matière végétale. Sur l'exemple de la truffe du désert, nous nous intéressons actuellement à l'étude de dattes locales. Notons qu'outre les PPOs, cette biomasse peut contenir d'autres produits d'intérêt, comme par exemple des anti-oxydants. La deuxième approche vise à réaliser des biocapteurs et bioréacteurs en utilisant ces PPOs, en essayant de trouver un compromis entre purification et stabilité/efficacité. En ce qui concerne le matériau hôte, la chimie sol-gel reste notre priorité mais présente néanmoins des problèmes de stabilité au long terme qu'il nous faudra résoudre, via des approches hybrides et/ou en substituant la silice par d'autres oxydes.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abdullah, J., Ahmada, M., Karuppiah, N., Henga, LY., Sidek, H. 2006. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators*, B 114: 604–609
- Abrash, H.I., Shih, D., Elias, W., Malekmehr, F. 1989. A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*, 21: 465-476.
- Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*, 55: 2363–2367.
- Adnan, TABT., Augustin, MA., Ghazali, HM. 1986. Polyphenoloxidase from Starfruit (*Averrhoa carambola*, L.). *Pertanika*, 9: 219-224.
- Al-Khalid, T. and El-Naas, MH. 2012. Aerobic degradation of phenols: a comprehensive review. *Critical reviews in Environmental Sciences and Technology*. 42:1631-1690.
- Alyward, F. and Haisman, DR. 1969. Oxidation system in fruits and vegetables-their relation to the quality of pressured products. *Advances in Food Research*, 17: 1-76.
- Ameer, Q. and Adeloju, SB. 2009. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11.
- Amiot, MJ., Flueriet, A., Chenynier, V., Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: Phytochemistry of fruits and vegetables. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*. 51-85.
- Anderson, JV. and Morris, CF. 2001. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *Crop Science*. 41: 1697-1705.
- Anderson, JW. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.
- Anosike, EO. and Ayaebene, AO. 1982. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- Anthon, GE. and Barrett, DM. 2002. Kinetics parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4119-4125.
- Arslan, O. and Doğan, S. 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1499-1504.
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ. 1997. Polyphenol oxidase from *Allium sp.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2861-2863.
- Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- Atlow, SC., Bonadonna-Aparo, L., Klibanov, AM. 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 26: 599-603.
- Avnir, D., Coradin, T., Lev, O., Livage, J. 2006. Recent bio-applications of sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 16 :1013-1030.
- Aydemir, T. and Akkanlı, G. 2006. Purification and characterization of polyphenoloxidase from celery root (*Apium graveolens*) and the investigation on enzyme activity of some inhibitors. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 1090-1098.
- Aydemir, T. 2010. Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties*, 13: 475-485.
- Aydemir, T., Kavrayan, D., Çinar, S. 2003. Isolation and characterisation of polyphenoloxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) Sayi, 21: 115-125.
- Baldwin, MJ., Root, DE., Pate, JE., Fujisawa, K., Kitajima, N., Solomon, EI. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *Journal of the American Chemical Society*, 114: 10421-10431.
- Bar, M. 2001. Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases. Magister scientiae, University of the Free State, Bloemfontein.
- Barrett, NE., Gryson, AS., Lewis, MJ. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 66: 73-80.
- Barthet, VJ. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot esculenta* C.) Root: Extraction, Purification and Characterization. Thesis. Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGill (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.
- Basha, KM., Rajendran, A., Thangavelu, V. 2010. Recent advances in the biodegradation of phenols: a review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*. 1: 219-234.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, QT., Bernard, P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 155-8.

- Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M. 2005. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” *Journal of Food Biochemistry*, 29: 470-485.
- Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E., Mayer, A. 1977. Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification. *Phytochemistry*, 16: 1153-1158.
- Bertrand, G., 1896. Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d'origine végétale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 122: 1215–1217.
- Bevilaqua, JV., Cammarota, MC., Freire DMG., Sant’Anna, JrGL. 2002. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19: 151–158.
- Bonner, WD. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427-452.
- Bouchilloux, S., McMachill, P., Mason, HS. 1963. The Multiple forms of mushroom tyrosinase, purification and molecular properties of the enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 238: 1699-1706.
- Braaksma, A., Schaap DJ. 1996. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology*, 7: 119-127.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr D. 2009. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 : 441-448.
- Burton, SG. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22: 459-487.
- Burton, SG., Boshoff, A., Edwards, W., Rose, PD. 1998. Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5: 411-416.
- Cabanes, J., Chazarra, S. Garcia-Carmona, F. 2002. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *Journal of Theoretical Biology*, 214: 321-325.
- Campanella, L., Sammartino, MP., Tomassetti, M. 1992. A new enzyme sensor for phenol determination in non aqueous and aqueous- medium. *Sensors and Actuators B*, 7:383-388.
- Campanella, L., Favero, G., Pastorino, M., Tomassetti, M. 1999. Monitoring the rancidification process in olive oils using a biosensor operating in organic solvents. *Biosensors and Bioelectronics*, 14:179-186.
- Carvalho, GMJ., Alves, TLM., Freire, DMG. 2000. L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84: 791-800.
- Casañola-Martín, GM., Khan, MTH., Marrero-Ponce, Y., Ather, A., Sultankhodzhaev, MN., Torrens, F. 2006. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 324-330.
- Chan, HT. and Yang, HY. 1971. Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarin cranberry. *Journal of Food Science*, 35: 169.
- Chang, TS. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Science*, 10: 2440-2475.
- Chaplin, M. and Bucke C. 1990. Enzyme technology, Cambridge University Press,
- Chaya Devi, CC., Tripathi RK., Ramaiah, A. 1989. pH-dependent interconvertible forms of mushroom tyrosinase with different kinetic properties. *Pigment Cell Research*, 2, 8-13.
- Chea, V., Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M.P., Sanchez, J. (2012) Optimization and characterization of an enzymatic membrane for the degradation of phenolic compounds. *Catalysis Today*. 193:49-56.
- Chen, L., Flurkey, WH. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*, 5: 109-120.
- Chen X., Hu, Y., Wilson, GS. 2002. Glucose microbiosensor based on alumina sol-gel matrix/electropolymerized composite membrane. *Biosens. Bioelectron.* 17:1005-1013.
- Chen, QX., Lu, HY., Zhu, CM., Lin, HN., Zhou, HM. 1998. The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int*, 45: 465-73.
- Chevalier, T., Rigal, DD., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gaillard, F., Richard-Forget, F., Fils-Lycaon, BR. 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 119: 1261-1269.
- Cho, YK. and Ahn, HK. 1999a. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*. 23: 577-592.
- Cho, YK. and Ahn, HK. 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*, 23: 593-605.

- Chutintrasri, B. and Noomhorm, A. 2006. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *LWT – Food Science and Technology*, 39: 492–495.
- Clark, LC. and Lyons, C., 1962. Electrode system for continuous monitoring of cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Science*, 102: 29-45.
- Claus, H. and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Comtat, M., Bergel, A., 1997. Biocapteurs : rêve ou réalité industrielle?. *Biofutur*, 171 :33-36.
- Craft CC., Audia, WM. 1962. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz*, 123: 211-219.
- Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*, 22 : 1279-1281.
- Dalmadi, I.; Rapeanu, G.; Van Loey, A.; Smout, C.; Hendrickx, M. 2006. Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*, 30: 56-76.
- Dawson, CR., Magee, RJ. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2: 817-831.
- Decker, H., Terwilliger, N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- Decker, H. 2005. Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), Encyclopedia of Inorganic Chemistry. *John Wiley & Sons*, II: 1159–1173.
- Decker, H., Jaenicke, E. 2004. Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 673-687.
- Della Longa S., Ascone I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, AC., Zarivi O., Miranda M. 1996. The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem*, 271: 21025-21030.
- Depagne, C., Masse, S., Link, T., Coradin, T. 2012. *Journal of Materials Chemistry*. 22 :12457-12460.
- Devece, C., Rodriguez-Lopez, JN., Fenoll, LG., Tudela, J., Catala, JM., de los Reyes, E., Garcia-Canovas, F. 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem*, 47: 4506-4511.
- Dicko, MH., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 306: 336-339.
- Dietler, C. and Lerch, K. 1982 In *Oxidases and Related Redox Systems*. King TE, Mason HS, Morrison M, eds, pp 305–317. Pergamon Press, New York.
- Dijkstra, L., Walker, JRL. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric*. 54: 229-234.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Güner, S. 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*. 77: 1–7.
- Dogan, M., Dogan, S. 2003. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *J Food Chem*, 39: 1-9.
- Dogan, M., Arslan, O., Dogan, S. 2002. Substrat specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxydase from different aubergine cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol*. 37: 415-423..
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., and Alkan, M. 2005a. purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 10224-10230.
- Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O. 2005b. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem*, 53: 776-785.
- Doğan, S., Diken, ME., Turhan, Y., Alan, Ü., Doğan, M., Alkan, M. 2011. Characterization and inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. polyphenoloxidase. *European Food Research and Technology*, 233: 293-301.
- D'Souza, SF. 2001. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron*. 16: 337-353.
- Duangmal, K., Owusu Apenten, RKA. 1999. Comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, 64: 351-359.
- Duckworth, HW., Coleman, JE. 1970. Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245: 1613-1625.
- Duran, N., Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*. 28: 83–99.

- Durand, G; Monson, P. 1974. Actualité scientifique et technique N°05 : les enzymes immobilisées.
- Eicken, C., Krebs, B and Sacchettini, JC. 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 677-683.
- Eidhin, N., Myrphy, E., O'Beirne, D. 2006. Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh .cv Bramley' Seedling) purification strategies and characterization. *Journal Of Food Science*, 71: 51-58.
- El Kaoutit, M., Bouchta, B., Zejli, H., Izaoumen, N., Temsamani, K.R. 2004. A simple conducting polymer-based biosensor for the determination of atrazine. *Anal. Lett.* 37, 1671–1681.
- El-Bayoumi, MA., Frieden, E. 1957. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications, 79: 4854-4858.
- Erat, M., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, OI. 2006. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chemistry*, 95: 503-508.
- Escribano J., Tudela J., Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F. 1989. A kinetic-study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions: application to the suicide inactivation of tyrosinase. *Biochem. J.* 262: 597–603.
- Espin, J. C., Wichers, H. J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem*, 47: 3518-3525.
- Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1091-1096.
- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, PA., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry*, 45: 1090-1094.
- Espín, JC., Morales, M., Varón, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.
- Fan, Y., Flurkey, WH. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- Fenoll, LG., Peñalver, MJ., Rodríguez-López, JN., García-Ruiz, PA., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2004. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- Fenoll, LG., Rodríguez-Lopez, J.N., Garcia-Molina, F., Garcia-Canivas, F., Tudela, J. 2002. Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34: 332-336.
- Fenoll, LG., Rodríguez-López, J.N., Varón, R; García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta-and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem*, 381: 313-320.
- Fiorentino D., Gallone A., Fiocco D., Palazzo, G., Mallardi, A. 2010. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 2033–2037.
- Flurkey, WH. 2002. Laccase: In *Handbook of Food Enzymology* (J.R. Whitaker, A.G.J.Voragen, and D.W.S. Wong, Eds.) Marcel Dekker, Inc. Chapter 40, 525-538.
- Fortea, M. I., Lopez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Carreno, J and Nunez-Delicado, E. 2009. Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson seedless*). *Food Chemistry*. 113: 1008-1014.
- Frenkel-Mullerad, H. and Avnir, D. 2005. Sol-Gel Materials as Efficient Enzyme Protectors: Preserving the Activity of Phosphatases under Extreme pH Conditions. *Journal of the American Chemical Society*. 127 :8077-8081
- Frieden, E., Ottesen, M. 1959. A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *Biochimica Biophysica Acta*, 34: 248-251.
- Friedman, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem*. 45: 1523-1540.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., Escribano, J. 2005. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem*. 386: 601-607.
- Gao, ZJ., Han, XH., Xiao, XG. 2009. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chemistry*. 117: 342-348.
- Garcia-Borrón., JC., Solano., F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res*. 15: 162-173.

- García-Molina, F., Peñalver, M.J., Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2005. Kinetic study of monophenol and o-diphenol binding to oxytyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 32: 185-192.
- Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K., Kafarski, P. 2002. Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem*. 269: 4098-4104.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F., Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215: 59-65.
- Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *Botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*. 105: 1047-1053.
- Gawlik-Dziki, U., Złotek, Z., and Świeca, M. 2008. Characterisation of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var capitata* L.). *Food Chemistry*. 107: 129-135.
- Gheibi, N., Saboury, AA., Haghbeen, K., Moosavi-Movahedi, AA. 2006. The effect of some osmolytes on the activity and stability of mushroom tyrosinase. *J. Biosci.* 31: 355-362.
- Giannenas I., Tontis D., Tsalie E., Chronis EF., Doukas D., Kyriazakis I. 2010. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 89 : 78-84.
- Gnangui, SN., Dué, EA., N'guessan Kouadio, J-P. E and Kouamé, LP. 2009. Effect of heat treatment on edible yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv longbô) polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal and plant sciences*. 2: 128 - 137.
- Golbeck, J.H and Cammarata, K.V. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*. 67: 977-984.
- Gómez-López, VM. 2002. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chemistry*, 77: 163-169.
- González, E. M.; De ancos, B.; Cano, M. P. 1999. Partial characterisation of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4068-4072.
- Gouzi H., Coradin, T., Delicado, EM., Ünal, U., Benmansour, A. 2010. Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3: 1-7.
- Gouzi, H., Benmansour, A. 2007. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5: 1-11.
- Gouzi, H., Depagne, C., Coradin, T. 2012. Kinetics and Thermodynamics of the Thermal Inactivation of Polyphenol Oxidase in an Aqueous Extract from *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 500-506.
- Gundoğmaz, G., Doğan, S., Arslan, O. 2003. Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various salvia species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia tomentosa* Miller). *Food Sci Technol Int*. 9: 308-315.
- Haghbeen, K., Saboury, AA., Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675: 139-146.
- Haldane, JBS. 1930. The enzymes. Green and Co Ed, Londres.
- Han, P., Chen, C.Q., Zhang, C.L., Song, K.K., Zhou, H.T., Chen, Q.X. 2008. Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Food Chem*. 107: 797-803.
- Harel, E., Mayer, AM., Lerner HR. 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric*. 21: 542-544.
- Harel, E., Mayer, AM., Shain, Y. 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum*. 17: 921-930.
- Hasegawa, S., Maier VP. 1980. Polyphenol Oxidase of Dates *J. Agric. Food Chem*. 28: 891-893.
- Hedenmo, M., Narvaez, A., Dominguez, E., Katakis, I. 1997. Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes. *J. Electroanal. Chem*. 425: 1-11.
- Hervás Pérez, JP., S'ánchez-Paniagua, López, M., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B. 2006. Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 429-439.
- Himmelfright, RS., Eickman, NC., Solomon, EI. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc*. 102.
- Hu, X., Leng, Z. 1995. Determination of cyanide using a tyrosinase amperometric biosensor with catechol as substrate. *Analyst*, 120:1555-1557.
- Ikehata, K., Nicell, JA. 2000. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog*. 16: 533-540.

- Irwin, PL., Pfeffer, PE., Doner, LW., Sapers, GM., Brewster, JD., Nagahashi, G., Hicks, KB. 1994. Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr. Res.* 256: 13–27.
- Jaiswal, V., DerMarderosian, A., Porter, JR. 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*, 118: 11–16.
- Janovitz-Klapp, AH., Richard, FC., Nicolas, J. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903–2907.
- Janovitz-Klapp, AH., Richard, FC., Goupy, PM., Nicolas, JJ. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38: 926–931.
- Jeong, SC, Jeong, YT, Yang, BK, Islam, R., Koyyalamudi, SR, Pang, G., Cho, KY., Song, CH. 2010. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*. 30 : 49–56.
- Jiang, YM. 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry*. 66: 75–79.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459–1483.
- Joslyn, MA., Ponting, JD. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3: 1–44.
- Kahn, V. 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.* 50: 111–115.
- Kahn, V. 1997. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J. Food Sci.* 42: 38–43.
- Kanade, SR., Paul, B., Rao, AGA., Gowda, LR. 2006. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid–pH activation. *Biochemical Journal*, 395, 551–562.
- Karbassi, F., Haghbeen, K., Saboury, AA., Rezaei-Tavirani, M., Ranjbar, B. 2004. Calorimetric, spectrophotometric and circular dichroism studies on the impact of sodium dodecyl sulfate on the mushroom tyrosinase structure. *Biologia*, 59: 319–326.
- Keilin, D., Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187–204.
- Keilin, D., Mann T. 1940. Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature*. 145: 304.
- Kertesz, D., Zito, R. 1962. Phenolase. In *Oxygenases*, ed. O. Hayaishi. Academic Press, New York. 307.
- Khan, AA., Akhtar, S., Husain, Q. 2006. Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulfate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *J. Mol. Catal B: Enzym.* 40: 58–63.
- Khan, V., Pomerantz, SH. 1980. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry*. 19, 379–385.
- Khatun, S., Absar, N., Ashraduzzaman, M. 2001. Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4: 1129–1132.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*. 5: 1084–1090.
- Kocaturk, S. and Yagar, H. 2010. Optimization of polyphenol oxidase immobilization in copper alginate beads. *Artif. Cell. Blood Subtit. Immob. Biotechnol.* 38 :157–163.
- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.
- Kochana, J., Gala, A., Parczewski, A., Adamski, J. 2008. Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391:1275–1281.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*. 101: 778–785.
- Krastanov, A., Alexieva, Z., Yernendzhiev, H. 2013. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences*. 13:67–93.
- Kubowitz, F. 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*. 299: 32–57.

- Kuby, S. A. 1991. In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), *CRC Press Inc., Boca Raton*. 301–339.
- Kumar Anil, VB., Mohane Kishor, TC., Murugan. K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.). *Food Chemistry*. 110: 328-333.
- Kuwabara, T., Katoh, Y. 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol*. 40: 1029-1035.
- Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A. 2000. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys*. 379: 1-6.
- Lax, AR., Vaughn, KC. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31.
- Lee, YJ., Lyu, YK., Choi, HN., Lee, WY. 2007. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon nanotube-titania-nafion composite film. *Electroanalysis*. 19 :1048-1054
- Lee, JM., Xu, GR., Kim, BK., Choi HN., Lee, WY. 2011. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon nanotubes-doped sol-gel-derived zinc oxide-nafion composite films. *Electroanalysis* 23 : 962-970.
- Lerch, K. 1995. Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. In Enzymatic browning and its prevention. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600. *American Chemical Society*. 64-80.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. In Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins, ed. H. Sigel. *Marcel Dekker, New York, Basel*. 143-86.
- Lerch, K. 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem*. 257: 6414–6419.
- Lerman, LS. 1953. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 39: 232-236.
- Li, J., Chia, LS., Goh, NK., Tan, SN. 1998. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*. 362:203-211
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*. 144 : 18–22.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci*. 94: 44-52.
- Lineweaver, H and Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc*. 56: 658-666.
- Livage, J., Coradin, T., Roux, C. 2001. Encapsulation of biomolecules in silica gels. *J. Phys : Condens. Matter*. 13 :R673.
- Liu, Z., Liu, B., Kong J., Deng, J. 2000. Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel-derived tyrosinase biosensor. *Analytical Chemistry*. 72 :4707-40712.
- Liu, BH., Cao, Y., Chen, DD., Kong, J., Deng, J. 2003. Amperometric biosensor based on a nanoporous ZrO₂ matrix. *Anal. Chim. Acta* 478 : 59–66
- Liu, ZM., Liu, YL., Yang, HF., Yang, Y., Shen, GL., Yu, RQ. 2005. A mediator-free tyrosinase biosensor based on ZnO sol-gel matrix. *Electroanalysis*, 17 :1065-1070.
- Loncle, D. 1992. Génie enzymatique. Biosciences et Techniques. Éditeurs doin, Paris. 393 pages.
- Lourenco, EJ., Neves, AV., Da Silva, MA. 1992. Polyphenol oxidase from sweet potato and properties. *Journal of Agricultural and Food Science*, 40, 2369–2373.
- Lowry, OH., Rosenbrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 93: 265-271.
- Luh, BS., Phithalopol, B. 1972. Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in Clingstone peaches. *J. Food Sci*. 37, 264
- Macrae, AR., Duggleby, RG. 1968. Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochemistry*. 7: 855-861.
- Maeda, K., Fukuda, M. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem*. 42: 361–368.
- Mai Anh, T., Dzyadevych, SV., Van MC., Renault, NJ, Duc, CN, Chovelon, J-M. 2004. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. *Talanta*, 63: 365–370.
- Majidi, MR., Asadpour, ZK., Gholizadeh, S. 2010. Nanobiocomposite modified carbon-ceramic electrode based on nano-TiO₂-plant tissue and its application for electrocatalytic oxidation of dopamine. *Electroanalysis* 22:1772–1780
- Marangoni, AG. 2002. Enzyme kinetics: a modern approach. John Wiley and Sons, N.Y. p 248.

- Marín-Zamora, ME., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., García-Ruiz PA. 2009. Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology*. 139: 163-168.
- Marin-Zamora, ME., Rojas-Melgarejo, F., Garcia-Canovas, F., Garcia-Ruiz, PA., 2006. Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on d-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol.* 126: 295–303.
- Marko-Varga, G., Emnéus, J., Gotton, L., Ruzgas, T. 1995. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends Anal Chem*,14: 319–28.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A., Poggi, V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. 63: 745-752.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195–200.
- Matheis, G. 1987a. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- Matheis, G. 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11 : 33-41.
- Mathew, AG ., Parpia, HA. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.* 19: 75-145.
- Mayberry, JM., Mallette, MF. 1962. Inhibition of the tyrosinase oxidation of one substrate by another. *The Journal of General Physiology*. 45: 1239-1245.
- Mayer, AM., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
- Mayer, AM. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry*. 26 : 11-20.
- Mayer, AM., Harel, E., Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catecholoxidase—A critical comparison of methods. *Phytochemistry*. 5: 783-789.
- Mayer, A.M., Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- Mayer, AM., Harel, E. 1994. Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. In: Food Enzymology. Volume II (Ed: Fox, PF) Elsevier Applied Science, London, 163-187.
- McCord, JD., Kilara A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci.* 48: 1479-1483.
- McEvily, AJ., Iyengar, R., Otwell, WS. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.
- Min, K., Yoo, Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- Miranda, M., Bonfigli, A., Zarivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D. 1992. Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science*. 81: 175-182.
- Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G .1996. White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science*. 120: 29-36.
- Montealeali, MR., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. 2010. A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- Moore, BM., Flurkey, WH. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 4982-4988.
- Moreau, T., Depagne, C., Suissa, G., Gouzi, H., Coradin, T. Preparation of aqueous sol-gel silica and titania multilayered thin films and their evaluation as biomolecular encapsulation hosts. *Journal of Materials Chemistry B*, 1:1235-1240.
- Mosher, DB., Pathak, MA., Fitzpatrick, TB eds. 1983. Update: dermatology in general medicine. pp 205–225; McGraw Hill, New York.
- Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A.; Mondal, B. Potential use of polyphenol oxidase (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Review in Environmental Science and Biotechnology*. 12:61-73.
- Muller, LA., Hinz, U., Zrýd, J-P. 1996. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, 42: 1511-1515.
- Nair, Cl., Jayachandran, K., Shashidhar, S. (2008) Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*. 7:4951-4958.
- Naish-Byfield, S., Riley, PA. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288: 63-67.

- Neeley, E., Fritch, G., Fuller, A., Wolfe, J., Wright, J., Flurkey, W. 2009. Variations in IC50 values with purity of mushroom tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3811–3823.
- Nelson, RM., Mason, H.S. Tyrosinase (mushroom).1970. *In* Methods in Enzymology (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), Academic Press, New York. 17: 626-632.
- Neves, VA., da Silva, MA., 2007. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food. Chem.* 55: 2424-2430.
- Nistor, C., Emneúș, J., Gorton L., Ciucu, A. 1999 Improved Stability and Altered Selectivity of Tyrosinase Based Graphite Electrodes for Detection of Phenolic Compounds, *Anal. Chim. Acta* 387 : 309-326
- Njagi, J., Chernov, MM., Leiter, JC., Andreescu, S. 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- Nuñez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. 1996. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *Journal of Chromatography. B* 680: 105-112.
- O'Sullivan, WJ. 1969. Stability constants of metal complexes. *In* Data for biochemical research. R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Jones. Oxford, England: 423-434.
- Ôba, K., Iwatsuki, N., Uritani, I., Alvarez, AM., Garcia, VV. 1992. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes in banana bud. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1027-1030.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocacaliskan, I., Şakiroğlu, H. 1995. Polyphenol oxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science*, 60: 495-499.
- Önez, Z., Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş. 2008. Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32: 396–414.
- Orenes-Piñero, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. 2006. Latent of polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 2172-2178.
- Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A., Dorantes-Alvarez, L., Sampedro, J.G., Najera H. 2011. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry*. 72: 82–88.
- Palmer, JK. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. 38: 508-513.
- Palmer, T. 1985. Understanding Enzymes. Second Edition. Ellis Horwood Series. British Library. Chichester, England. 161, 162, 297, 299, 314-331.
- Pandey, PC., Upadhyay, S., Tiwari, I., Singh, G., Tripathi, VS. 2001, A novel ferrocen encapsulated palladium-linked ormosil-based electrocatalytic dopamine biosensor. *Sensors and actuators B*, 75:48-55.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994a. *Agaricus bisporus* tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994b. *Agaricus bisporus* tyrosinase–II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.* 26: 223-228.
- Papkovsky, DB., Ghindilis, AL., Kurochkin, IN. 1993. Flow-cell fibre-optic enzyme sensor for phenols. *Anal. Lett.* 26: 1505–1518.
- Park, YK., Sato, HH., Almeida, TD., and Moletti, RH. 1980. Polyphenol oxidase of mango. *J. Food Sci.* 45: 1619-1624.
- Park, JA., Kim, BK., Choi, HN., Lee, WY. 2010. Electrochemical Determination of Dopamine Based on Carbon Nanotube-Sol-Gel Titania-Nafion Composite Film Modified Electrode. *Bulletin of The Korean Chemical Society*. 2010 :3123-3127.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, HS., Bae, H. 2007. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res.* 21: 805-816.
- Pathak, SU., Ghole, VS. 1994. Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 36: 1165-1167.
- Patil, S.S., Zucker, M. 1965. Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry*. 240: 3938-3943.
- Patnaik, PR. 2002. Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 198-200.
- Paul, B., Gowda, LR. 2000. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3839-3846
- Pena, N., Reviejo, AJ., Pingarron, JM. 2001. Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta*. 55: 179-187.

- Pérez-Gilabert M., Morte, A., G-Carmona, F. 2004. Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*. 166: 365–370.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. 2001a. Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiology Plantarum*. 133: 203-209.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. 2001b. Partial Purification, Characterization, and Histochemical Localization of Fully Latent Desert Truffle (*Terfezia Clavaryi* Chatin) Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1922-1927.
- Pierre, AC., 2004. The encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and biotransformation*. 22:145-170.
- Pifferi, PG., Baldassari, L., Cultrera, R. 1974. Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J Sci Food Agric*. 25: 263-270.
- Powell, A., Siu, N., Inlow, J., Flurkey, WH. 2007. Immobilized metal ion affinity chromatography of mushroom tyrosinase. *Scientific Journals International: Journal of Physical and Natural Sciences*. 1:1-13.
- Qiu, L., Chen, QH., Zhuang, JX., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, YJ., Chen, QX. 2009. Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*. 112: 609-613.
- Râpeanu, G., Van Loey A., Smout, C., and Hendrickx, M. 2006. Thermal and high pressure inactivation kinetics of Victoria grape polyphenol oxidase: from model systems to grape must. *Journal of Food Process Engineering*. 29: 269-286.
- Râpeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M. 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, 94: 253-261.
- Reinhammar B., Malmström B. G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. in Copper Proteins. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A and Sanjust, E. 2002. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17: 207-218.
- Rivas, NDJ., Whitaker, JR. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52: 501-507.
- Robb, DA. 1984. Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida. 207-241.
- Robert, C., Rouch, C., Cadet, F. 1997. Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem*. 59: 355-60.
- Rocha, AMCN., Morais, AMMB. 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, 12: 85-90.
- Rocha, AMCN., Cano, MP., Galeazzi, MAM., Morais, AMMB. 1998. Characterisation of "Starking" apple polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric*. 77: 527–534.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 78: 809-816.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Monkiewicz, M., Haber, J. 2002. Enzymatic activity of the *A. bisporus* tyrosinase in AOT/isooctane water-in-oil microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*. 208: 347-356.
- Rodriguez-Lopez, JN., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810.
- Ros, JR., Rodríguez-López, JN., García-Cánovas, F. 1994. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- Royse, DJ. 1996. Specialty mushrooms. - In: Progress in New Crops (Ed. J. Janick), 464-475. ASHS Press, Arlington, USA.
- Samborska, K. 2007. Enhancement of thermal stability of aspergillus oryzea alpha-amylase using stabilizing additives. *Acta Agrophysica*. 9: 233-244.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., García-Carmona, F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol*. 91:1481–1487.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, JN., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1247: 1-11.
- Schoenbein, CF. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11: 137-141.

- Seetharam, G., Saville, B.A. 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol.* 1 : 747–753.
- Seetharam, GB., Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436–440.
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinena, M-L, Steffensen, C.L., Bucherta, J., Kruus, K. 2009. Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology.* 44: 1–10.
- Seo, S-Y., Sharma, V. K., Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry.* 51: 2837-2853.
- Sezginürk, MK., Akin, AŞ., Dinçkaya, E. 2010. A biosensor utilizing quince (*Cydonia vulgaris*) Tissue homogenate for dopamine determination in pharmaceutical preparations. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40: 129-138.
- Shan, D., Mousty, C., and Cosnier, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- Sharma, NM., Kumar, S., Sawhney, SK. 2003. A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 137-141.
- Shen, S., Hsu, AF., Foglia, TA., Tu, SI. 2001. Immobilization of enzymes and bioactive proteins in pylosilicates U.S patent. 16pp.
- Shi Y-L., Benzie I.F.F., Buswell J A. 2002. Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences.* 70: 1595–1608.
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. 2001. The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter.* 19: 381a-381h.
- Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y., Xu, X. 2002. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. *Acta Biochim Polon.* 49: 1029-1035.
- Siddiq, M., Sinha, NK., Cash, YN. 1992. Characterization of a polyphenol oxidase from Stanley plums. *Journal of Food Science*, 57: 1177-1179.
- Siegbahn, PEM. 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.
- Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* 9: 577-590.
- Simkus, RA., Laurinavicius, V., Boguslavsky, L., Skotheim, T., Tanenbaum, SW., Nakas, JP., Slomczynski, DJ. 1996. Laccase containing sol-gel based optical biosensors, *Anal. Lett.* 29: 1907.
- Singh, N., Singh, R., Kaur, K., Singh, H. 1999. Studies of the physico-chemical properties and polyphenoloxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. *Food Chemistry.* 66: 241-247.
- Singh, S., Jain, DVS., Singla, ML. 2013. Sol-gel based composite of gold nanoparticles as matrix for tyrosinase for amperometric catechol biosensors. *Sensors and Actuators B*, 182:161-169.
- Smith, D.M and Montgomery, M.W. 1985. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry.* 24: 901-904.
- Smith, J.L., Krueger, RC. 1962. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry.* 237: 1121-1128.
- Socerhall, I., Soderhall, K. 1989. Purification of prophenol oxidase from *Dacus carota* cell cultures. *Phytochem.* 28: 1805-1809.
- Sojo, MM., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. 1998. Monophenolase activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4931-4936.
- Sojo, MM., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.
- Solomon, El., Sundaram, UM., Machonkin TE. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- Song, K.K., Lin, J.F., Chen, QX. 2005. Inhibitory effects of 4-isopropylsalicylaldehyde on mushroom tyrosinase. *Food Chem* 2005; doi: 10.1016/j.foodchem. 2005.08.021.
- Soysal, Ç. 2008. Kinetics and thermal activation /inactivation of starting apple poly phenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation.* 32: 1034–1046.
- Soysal, C., Söylemez, Z. 2004. Properties of wheat bran polyphenol oxidase. *Nahrung/Food.* 48: 5-8.
- Steffens, JC., Harel, E., Hunt, MD., Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. *In Polyphenols* 96. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 230-250.

- Stelzig, DA., Akhtar, S., Ribeiro, S. 1972. Catechol oxidase of red delicious apples. *Phytochem.* 11: 535 - 539.
- Strothkamp, KG., Jolley, RL., Mason, HS. 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical And Biophysical Research Communications.* 70: 519-524.
- Strubi, P., Escher, F., Neukom, H. 1975. Neuere arbeiten uber die technologie der apfelnektar herstellung. *Industry Obst-Gemuseverwert.* 60: 349-351.
- Stumbo, CR. 1973. Thermobacteriology in food processing (2nd Ed). New York: Academic Press, pp. 336.
- Sugumaran, M., Dali, H., Semensi, V., Hennigan, B. 1987. Tyrosinase-catalyzed Unusual Oxidative Dimerization of 1,2-Dehydro-N-acetyldopamine. *The Journal of Biological Chemistry.* 262: 10546-10549.
- Sun, WQ., Payne, GF., Moas, WSGL., Chu, JH., Wallace, KK. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* 8: 179-186.
- Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- Terefe, NS., Yang, YH., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. 2009. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 11: 52-60.
- Thomas, P., Janave, MT. 1986. Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *Journal Of Food Science.* 51: 384-387.
- Thygesen, PW., Dry, IB., Robinson, SP. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
- Topçu, S., Sezgintürk MK., Dinçkaya, E. 2004. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics.* 20 : 592–597.
- Tran-Minh. C., 1991. Les biocapteurs. Principes, construction et applications. Masson, Paris.
- Trebst, A., Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research.* 46: 41-44.
- Tripathi, RK., Chaya Devi., C., Ramaiah, A. 1988. pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in human skin. *Biochem. J.* 252: 481-487.
- Trowbridge, GG., Krehbiel, A., Laskowski, M., Jr. 1963. Substrate activation of trypsin. *Biochemistry.* 2: 843-848.
- Tsai S-Y, Wu T-P, Huang S-J, Mau J-L. 2007. Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. *Food Chemistry.* 103: 1457–1464.
- Tuncagil, S., Kayahan, SK., Bayramoglu, G., Arica, MY., Toppare, L. 2009. L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 58: 187–193.
- Turner, EM. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society.* 63: 541-547.
- Ünal, MÜ., Şener, A. 2006. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J. Sci. Food Agric.* 86: 2374–2379.
- Ünal, MÜ. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry,* 100: 909-913.
- Ünal, MÜ., Şener, A., Şen, K. 2007. Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) polyphenol oxidase. *International Journal of Food Science and Technology.* 42: 1123–1127.
- Ünal, M.Ü. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.* 100: 909-913.
- Updike SJ, Hicks, GP. 1967. The enzyme electrode. *Nature,* 214: 986-988.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Van Gelder, CWG., Flurkey, WH., Wichers, HJ. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45 : 1309-1323.
- Van Leeuwen J., Wichers HJ. 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res.* 103: 413–418.
- Van Loey, A., Haentjens, TH., Hendrickx, ME., Tobback, PP. 1997. The development of an enzymic time temperature integrator to assess thermal efficacy of sterilisation of low-acid canned foods. *Food Biotechnol.* 11: 147-168.
- Vanni, A., Gastaldi, D., Giunta, C. 1990. Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the mushroom tyrosinase. *Ann. Chim. (Rome).* 80: 35-60.

- Varoquaux, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Thèse Univ. de Dijon*, 134 p.
- Vaughn KC., Lax AR., Duke SO. 1988. Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- Vaughn, KC., Duke, SO. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- Vedrine C., Fabriano S., Tran-Minh C. 2003. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support,. *Talanta*, 59: 534-544.
- Vu, TKH., Le, VVM. 2008. Biochemical studies on the Immobilization of the Enzyme invertase (EC.3.2.1.26) in Alginate Gel and its Kinetics, *Asean Food Journal*, 15: 73-78.
- Waliszewski, KN., Márquez, O., Pardio, VT. 2009. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry*. 117: 196-203.
- Walker JRL., Ferrar, PH. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.*: 836-839.
- Walker, JRL., Ferrar, PH. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15: 457-498.
- Walker, JRL., Wilson, EL. 1975. Studies on the enzymatic browning of apples. Inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids. *J Sci Food Agric.* 26: 1825-1831.
- Wang, B., Zhang, J., Dong, S. 2000. Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 15:397-402.
- Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Liu, S., Gong, Z., and Luo, Y. 2007. Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tainong") pulp. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 45-55.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V and Hendrickx M.E. 1998a. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 60: 292-300.
- Weemaes, CA., Ludikhuyze, LR., Den Broeck, IV., Hendrickx, ME., Tobback, PP. 1998b. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm.-wiss. U.-Technol.* 31: 44-49.
- Weil, J-H. 2001. Biochimie générale. 9e édition Dunod, Paris, 655.
- Whitaker J., Lee, CY. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). *Washington, American Chemical Society*, 2-7.
- Whitaker, JR. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) Food enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Wichers, HJ., Van den Bosch, T., Gerritsen, YAM., Oyevaar, JI., Ebbelaar, MCEM., Recourt, K., Kerrigan, RW. 1995. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Science and Cultivation of Edible Fungi, Elliott* (ed.) © Balkema, Rotterdam: 723-728.
- Wilson, K., Walker, J. 1996. Practical biochemistry principles and techniques. Fourth Edition. Cambridge Low Price Editions. *Cambridge University Press*. 586 pages.
- Wisemann, KW., Montgomery, MW. 1985. Purification of d'Anjou pear (*Pyrus communis* L.) polyphenol oxidase. *Plant physiol.* 78: 256-260.
- Wong, TC., Luh, BS., Whitaker, JR. 1971. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 48: 19-23.
- Xu, J., Zheng, T., Meguro, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). *J Wood Sci.* 50: 260-265.
- Yağar, H., Sağiroğlu, A. 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk J Chem.* 26: 97-103.
- Yağar, H. 2004. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from celery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 34: 387-397..
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M. 2005. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829.
- Yang, C-P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, MD., Nakamura, N., Hayashi, N. 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2732-2735.
- Yemenicioğlu, A., Cemerioğlu, B. 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.

- Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroglu, B. 1999. Some characteristics of polyphenol oxidase and peroxidase from taro (*Colocasia antiquorum*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 23: 425-430.
- Yemeniciogolu, A., Zkan, M., Cemerogolu, B. 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- Yin, H., Zhou, Y., Xu, J., Ai, S., Cui, L., Zhu, L. 2010. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 659: 144–150.
- Ylostalo, J., Srivastava, K., Flurkey, WH. 2001. Characterization of a tyrosinase isoform from the cap skin of *Portabella* mushrooms. *Journal of Food Biochemistry.* 25: 493-507.
- Yoruk, R., Marshall, MR. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry.* 27: 361-422.
- Yu, J., Liu, S., JU, H. 2003, Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. *Biosensors and Bioelectronics.* 19:509-514.
- Yue-Ming, J., Zauberman, G., Fuchs, Y. 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology.* 10: 221–228.
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F ; Pacioni, G., Miranda, M. 2003. Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters.* 220: 18-88.
- Zawistowski, J., Biliadenes, CG., Murray, ED. 1988. Purification and characterization of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L) polyphenol oxidase. *J. Food Biochem.* 12: 1-4.
- Zawistowski, J., Biliaderis, CG., Eskin, NAM. 1991. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- Zejli, H., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, JL., Naranjo-Rodriguez I., Liu, B., Temsamani, KR., Marty, JL. 2008. Phenol biosensor based on sonogel-carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization. *Analytica Chimica Acta* 612:198-203.
- Zhang, X., Flurkey, WH. 1997. Phenoloxidases in Portabella Mushrooms. *Journal Of Food Science.* 62: 97-100.
- Zhang, T., Tian, B., Kong, J., Yang, P., Liu, B. 2003. A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic-organic hybrid titania sol-gel matrix. *Analytica Chimica Acta.* 489:199-206.
- Zhou, HW., Feng, X. 1991. Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *J.Sci.Food Agric.* 57: 307-313.
- Zinkernagel, V. 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115: 257-266.
- Ziyan, E., Pekyardimci, Ş. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- Ziyan, E., Pekyardimci, S. 2004. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.
- Zynek, K., Bryjak, J., Polakovič, M. 2010. Effect of separation on thermal stability of tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 66: 172–176.

Ce travail concerne l'extraction d'enzymes de la famille des polyphénol oxydases à partir de champignons, leur caractérisation biochimique et leur immobilisation dans des matrices solides. Ces enzymes ont tout d'abord été extraites du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) puis partiellement purifiées. Une étude de leur activité enzymatique, de leur domaine de stabilité et de leur comportement thermique a été effectuée, ainsi que l'identification d'inhibiteurs. Cette approche a été étendue à la polyphénol oxydase de la truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.). Ces deux enzymes ont ensuite été piégées dans des gels de silice pour le dosage de la dopamine par un biocapteur optique et dans un gel d'alginate pour la dégradation du phénol.

This work is devoted to the extraction of enzymes belonging to the polyphenol oxidase family from mushrooms, their biochemical characterization and their immobilization in solid hosts. These enzymes were first extracted from Paris mushrooms (*Agaricus bisporus*) and partially purified. A study of their enzymatic activity, stability conditions and thermal behavior was performed, together with the identification of inhibitors. A similar approach was applied to polyphenol oxidase extracted from desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.). These enzymes were then trapped in silica gels for dopamine determination using an optical biosensor and in an alginate gel for phenol degradation.

